

BRUNA BUCH

**ECOFISIOLOGIA DE MORFOTIPOS RETO E ESPIRALADO DE
Cylindrospermopsis raciborskii (CYANOBACTERIA) EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientadora: Prof. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Rio Claro

2009

BRUNA BUCH

**ECOFISIOLOGIA DE MORFOTIPOS RETO E ESPIRALADO DE
Cylindrospermopsis raciborskii (CYANOBACTERIA) EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Comissão examinadora

Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira
Carlos Eduardo de Mattos Bicudo
João Dias de Toledo Arruda Neto

Rio Claro, 24 de julho de 2009.

Ao meu pai Luiz Antonio Buch, sempre no meu coração e no meu pensamento, pelos valores transmitidos: coragem, persistência, empenho, amor e fé, dedico.

À minha mãe Maria Helena de Oliveira Buch por sua determinação, empenho, força e amor, que me permitiram tantas realizações, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, docente da Universidade de São Paulo - Campus Piracicaba, por me apresentar à carreira científica e por sempre me incentivar a buscar primazia em todos os trabalhos e apresentações realizados ao longo de minha Iniciação Científica e Mestrado, por sua dedicação à minha formação acadêmica e por todo o conhecimento conferido.

À Prof. Dra. Ariadne do Nascimento Moura, docente da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela dedicação, paciência, conhecimento e amizade dispensados ao longo de minha Iniciação Científica.

Ao Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto, docente da Universidade de São Paulo, por todo auxílio prestado, pelas dezenas de dúvidas estatísticas sanadas e pelos cafés.

Ao Prof. Dr. Silvio Sandoval Zocchi, docente da Universidade de São Paulo – Campus Piracicaba, pela imensa contribuição com a análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, docente da Universidade de São Paulo – Campus Piracicaba, ao técnico Luis “Cometa” Lucatti e a todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Bioquímica, do Departamento de Ciências Biológicas, por todo auxílio e estrutura cedidos.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório, agradeço pelo apoio incondicional tanto nos aspectos profissionais quanto nos pessoais, por todos os momentos compartilhados, enfim, pela amizade: Selma “Rapel” Gouvêa Barros, personalidade única que iniciou comigo essa grande aventura como pesquisadora, Talita Caroline Hereman, pela imensa contribuição neste trabalho e a quem admiro tanto pela delicadeza e empenho, Érika “Kinha” Cavalcante Silva, amiga arretada e super dedicada, Fabricio “Lama” Saglietti Meira Barros, Marcela “Morãguet” Firens da Silveira, Viviane “Lolly” Piccin dos Santos, Danilo Mamede, Paulo “K-juru” Jaoude e Romeu Aparecido Rocha.

Ao biólogo e mestrando Gabriel Lourenço Brejão, pela amizade, amor, conselhos, auxílios, socorros e dedicação divididos.

Às minhas irmãs, Beatriz e Bianca pela força.

À minhas tias, tios e primos pelo apoio.

Às amigas Daniela Gimenes e Nely Tedesco, por todo apoio.

Ao amigo Guilherme Saglietti, pelo auxílio com os softwares matemáticos.

A todos que me motivaram e de alguma maneira fizeram parte dessa etapa concluída.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“Ciência é o conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada”.

Immanuel Kant

RESUMO

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie formadora de florações potencialmente tóxicas em sistemas aquáticos eutrofizados, inclusive naqueles utilizados para abastecimento público, podendo trazer riscos à saúde humana. Esta espécie apresenta morfologia do tricoma reto, sigmóide e espiralado, sendo que as razões para esta variação ainda não foram claramente definidas. Estudos comparativos de seqüências genéticas têm demonstrado que a morfologia não está relacionada à filogenia do gênero *Cylindrospermopsis* e que os diferentes morfotipos representam uma única espécie. Os objetivos deste estudo foram: avaliar os efeitos de duas diferentes intensidades luminosas (30 e 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperaturas (21 e 31 °C) no crescimento e na morfologia de tricomas de uma linhagem reta (ITEP28) e outra espiralada (ITEP31) e, testar a hipótese de que ambos os morfotipos respondam negativamente à intensidade luminosa e temperatura altas. As linhagens reta e espiralada apresentaram pequenas diferenças na morfometria celular nas diferentes condições testadas. Além disso, a linhagem espiralada apresentou alterações na morfologia do tricoma, mostrando uma plasticidade fenotípica maior em relação à linhagem reta. Ambas as linhagens se adaptaram às condições testadas, embora a linhagem reta tenha apresentado velocidades máximas ($V(x)= 3,21; 3,63; 3,89$) de crescimento maiores que a linhagem espiralada ($V(x)= 0,97; 1,07; 1,61; 1,80$). Na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21 °C, a linhagem reta não atingiu a fase exponencial do crescimento, enquanto a linhagem espiralada demorou para atingir a velocidade máxima de crescimento, e este foi interrompido antes. Nas condições de temperatura baixa (21 °C) não houve produção de acinetos. Além disso, esta condição de temperatura baixa aliada a intensidade luminosa alta (90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) prejudicou o crescimento de ambas as linhagens. Deste modo, os resultados encontrados contrariam a hipótese proposta de que ambos os morfotipos são susceptíveis a intensidade luminosa e temperatura altas em condições controladas, uma vez que ambos apresentaram as maiores velocidades de crescimento na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31 °C (ITEP28: $V(x)= 3,89$; ITEP31: $V(x)= 1,80$).

Palavras-chave: Cyanophyceae. Taxonomia. Cultivo. Variação morfológica. Curvas de crescimento.

ABSTRACT

Cylindrospermopsis raciborskii is a potentially toxic bloom former species in eutrophic aquatic systems, including water supply reservoirs where it can bring risks to human health. This species shows straight, sigmoid and coiled trichome morphology and the reasons to this variation aren't clarified yet. Comparative studies of genetic sequences have been indicated that morphology isn't related with the *Cylindrospermopsis* genus phylogeny, thus the different morphotypes represents a single species. The aims of this study were: to evaluate the effects of two different light intensities (30 and $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and temperatures (21 and 31°C) on growth and morphology of straight (ITEP28) and coiled (ITEP31) morphotypes and, to test the hypothesis that both morphotypes respond negatively to the high light intensity and temperature. The straight and coiled morphotypes showed a little difference in the cell width and length measurements in the tested conditions. Moreover, the coiled trichome exhibited morphological changes that indicated greater phenotypical plasticity than the straight one. Both strains were adapted to the tested conditions, although the straight one showed higher growth velocity ($V(x) = 3,21; 3,63; 3,89$) than the coiled one ($V(x) = 0,97; 1,07; 1,61; 1,80$). In the condition of $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 21°C , the coiled morphotype delays to reach the maximum growth velocity, thus the growth was interrupted before that. In the conditions of low temperature (21°C) there is no akinetes production. Furthermore, this condition of low temperature associated with high light intensity ($90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) harmed the growth of both morphotypes. Therefore, the results found opposed to the considered hypothesis that both morphotypes are susceptible to the high light intensity and temperature in culture controlled conditions, since both morphotypes reached the highest growth velocity in the condition of $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C (ITEP28: $V(x) = 3,89$; ITEP31: $V(x) = 1,80$).

Key-words: Cyanophyceae. Taxonomy. Cyanobacteria culture. Morphological changes. Growth curves.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens utilizadas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> . ITEP: Instituto Tecnológico de Pesquisa do Estado de Pernambuco.....	10
Tabela 2. Condições de luz e temperatura utilizadas em cada experimento, com meio de cultivo BG-11, pH 7,8, fotoperíodo 14:10 horas (claro:escuro) para as linhagens ITEP28 (n=2) e ITEP31 (n=2). a. ITEP28. b. ITEP31.....	11
Tabela 3. Tabela comparativa com as larguras, em μm , das células vegetativas (n=400), heterócitos (n=100-200) e acinetos (n=60-150) nas diferentes condições testadas. M: média; DP: desvio padrão; CV: célula vegetativa; H: heterócito; A: acineto; -: ausente.....	24
Tabela 4. Tabela comparativa com os comprimentos, em μm , das células vegetativas (n=400), heterócitos (n=100-200) e acinetos (n=60-150) nas diferentes condições testadas. M: média; DP: desvio padrão; CV: célula vegetativa; H: heterócito; A: acineto; -:ausente.....	25
Tabela 5. Estimativas dos parâmetros do modelo logístico, velocidade de crescimento sob os diferentes tratamentos e respectivos coeficientes de determinação (R^2). ϕ_1 : tamanho máximo da população após um período de tempo bastante longo ($x \rightarrow \infty$). ϕ_2 : tempo para que a população atinja a metade do tamanho máximo. ϕ_3 : parâmetro de escala, inversamente proporcional à velocidade máxima de crescimento.....	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Comparação das medidas de largura e comprimento em μm de células vegetativas de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **b.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **d.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C 27

Fig. 2. Comparação das medidas de largura e comprimento em μm de heterócitos e acinetos de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **b.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **d.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C 28

Fig. 3. Tricomas da linhagem reta (ITEP28). **a.** Heterócitos indicados pelas setas. **b.** Acineto indicado pela seta. **c.** Heterócitos em ambas as extremidades, indicados pelas setas. **d.** Acineto indicado pela seta.....29

Fig. 4. Tricomas da linhagem espiralada (ITEP31). **a.** Heterócitos em ambas as extremidades indicados pelas setas. **b.** Heterócito indicado pela seta. **c.** Acinetos indicados pelas setas. **d.** Heterócito indicado pela seta.....30

Fig. 5. Alterações morfológicas da linhagem reta (ITEP28). **a.** Tricoma constrito indicado pela seta. **b.** Tricoma com extremidade bifurcada indicado pela seta. **c.** Tricoma fino indicado pela seta.....31

Fig. 6. Alterações morfológicas da linhagem espiralada (ITEP31). **a.** Tricoma constrito indicado pela seta. **b.** Tricomas retos ao final da curva de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** Tricoma com extremidade bifurcada. **d.** Tricoma fino indicado pela seta.....32

Fig. 7. Curvas de crescimento de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **b.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **d.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C 33

Fig. 8. Comparação das velocidades máximas de crescimento em todas as condições testadas para ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado).....34

Fig. 9. Curvas de velocidade de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **b.** $90\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . As linhas tracejadas representam a condição de $90\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . As setas indicam a velocidade máxima de crescimento.....35

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Divisão Cyanophyta.....	1
1.2. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> : taxonomia, distribuição e ecologia.....	2
1.3. Influência da luz e da temperatura na fisiologia de cianobactérias.....	7
1.4. Objetivos.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Linhagens e condições de cultivo.....	10
2.2. Obtenção das curvas de crescimento.....	10
2.3. Análise morfológica.....	11
2.4. Contagem.....	12
2.5. Análise dos dados referentes às curvas de crescimento.....	12
3. RESULTADOS.....	14
3.1. Morfologia.....	14
3.2. Curvas de crescimento e velocidade.....	16
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Divisão Cyanophyta

As cianobactérias estão entre os procariotos mais antigos que habitam o planeta. Estima-se que estes organismos fotossintetizantes tenham surgido a 2,7 bilhões de anos atrás. As cianobactérias liberam O_2 como produto final da fotossíntese e admite-se que tenham contribuído para o aumento nos níveis de oxigênio da atmosfera Proterozóica, o que permitiu a evolução de organismos aeróbios eucariotos (HOEK, 1997; LEE, 2008).

Em consequência de sua longa história evolutiva, as cianobactérias acumularam adaptações morfológicas, fisiológicas, ecológicas e bioquímicas que permitiram a colonização de diferentes tipos de habitat (HOEK, 1997; LEE, 2008).

As cianobactérias possuem organização celular simples muito semelhante às bactérias Gram-negativas (HOEK, 1997). No entanto, apresentam clorofila *a*, como todos os organismos fotossintetizantes, e pigmentos acessórios nos tilacóides (RAVEN et al., 2007).

Uma adaptação fisiológica ecologicamente vantajosa para as espécies planctônicas de cianobactérias é a presença de aerótopos, sistema de vesículas de gás que controlam a flutuabilidade e, conseqüentemente, a posição na coluna d'água. Esta habilidade permite que estes organismos busquem melhores condições de luz e concentração de nutrientes (LEE, 2008; RAVEN et al., 2007). Além disso, cianobactérias com aerótopos freqüentemente formam florações em ecossistemas aquáticos eutróficos, as quais se caracterizam por um crescimento populacional excessivo na superfície d'água, provocando gosto e odor desagradáveis (HOEK, 1997).

Entre as adaptações fisiológicas adquiridas por algumas cianobactérias destacam-se: a capacidade de diferenciação das células vegetativas em heterócitos (células fixadoras de nitrogênio) e acinetos (células de resistência), presentes apenas na ordem Nostocales (LEE, 2008).

Algumas cianobactérias também são capazes de produzir diversas toxinas (cianotoxinas). As cianotoxinas são metabólitos secundários com efeitos nocivos para outros organismos cuja função ainda não foi totalmente esclarecida. Acredita-se, no entanto, que estes compostos possam evitar a herbivoria e serem vantajosos

na competição com outras microalgas. A ingestão de água contaminada por cianotoxinas têm sido a causa de envenenamento e morte de gado, animais de estimação e selvagens em diversos lugares do mundo (CARMICHAEL, 1992).

Segundo Lee (2008), o seqüenciamento dos ácidos nucléicos começa a elucidar as relações evolucionárias entre as cianobactérias. Estudos sobre a filogenia molecular deste grupo têm mostrado pouca relação entre caracteres morfológicos e evolutivos, com exceção das cianobactérias heterocitadas (ordem Nostocales), as quais são estreitamente relacionadas entre si. Este autor propõe a divisão da classe Cyanophyceae em apenas três ordens: Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales; com o intuito de simplificar a classificação das cianobactérias (LEE, 2008).

Populações naturais de cianobactérias são compostas por uma variedade de desvios morfológicos, ecofisiológicos e químicos dificultando o estabelecimento de critérios taxonômicos baseados apenas na morfologia. Portanto, uma abordagem polifásica combinando métodos moleculares, citomorfológicos, bioquímicos e ecológicos que respeitem as características mais estáveis seria o melhor método para uma moderna classificação das cianobactérias (KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 2005).

1.2. *Cylindrospermopsis raciborskii*: taxonomia, distribuição e ecologia

Cylindrospermopsis (etimologia: semelhante à *Cylindrospermum*) é um gênero pertencente à ordem Nostocales, família Nostocaceae. Caracteriza-se por apresentar tricomas retos ou enrolados espiraladamente afilando-se suavemente em direção as pontas; células cilíndricas com pouca ou nenhuma constrição na parede celular; heterócitos sempre terminais e acinetos presentes na posição intercalar (SEENAYYA e SUBBA RAJU, 1972 apud KOMÁREK e HAUER, 2008). A reprodução ocorre por fragmentação do tricoma ou através da germinação de acinetos. Todas as espécies descritas são planctônicas dulciaquícolas e muito comuns em regiões tropicais, podendo também ocorrer em regiões temperadas na estação do verão (KOMÁREK e KOMÁRKOVÁ, 2003 apud KOMÁREK e HAUER, 2008).

Atualmente existem dez espécies descritas para o gênero com base em critérios morfológicos. De uma maneira simples, as espécies que apresentam

tricoma com morfologia reta são: *C. africana* Komárek *et* Kling, *C. cuspis* Komárek *et* Kling e *C. raciborskii* (Woloszynska) Seenayya *et* Subba Raju (eventualmente apresentando tricomas espiralados) (CRONBERG e KOMÁREK, 2003; KOMÁRKOVÁ, 1998). As espécies que apresentam tricoma com morfologia espiralada são: *C. catemaco* Komárková-Legnerová, *C. curvispora* Watanabe, *C. helicoidea* Cronberg *et* Komárek, *C. philippinensis* (Taylor) Komárek e *C. taveriae* Komárek *et* Kling (CRONBERG e KOMÁREK, 2003; KOMÁRKOVÁ, 1998). Recentemente duas novas espécies foram descritas, *C. sinuosa* Couté *et al.* e *C. acuminato-crispa* Couté *et* Bouvy (KOMÁREK e HAUER, 2008).

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi inicialmente descrita como *Anabaena raciborskii* por Woloszynska (1912) a partir de amostras planctônicas coletadas de lagos em Java, Indonésia, de 1899 a 1900. Esta espécie apresentava tricomas reto e espiralado, com extremidades ligeiramente estreitas e heterócitos dispostos apicalmente. Mais tarde, a disposição apical dos heterócitos foi considerada uma característica específica deste táxon. Em 1923, Miller descreveu o gênero *Anabaenopsis*, o qual se caracterizava também pelo desenvolvimento apical dos heterócitos, *Anabaena* foi então transferida para o gênero *Anabaenopsis* por Elenkin (1923). O nome *Anabaena raciborskii* permaneceu como basônimo da espécie (KOMÁREK e HAUER, 2008; KOMÁRKOVÁ, 1998; PADISÁK, 1997).

Após estudos sobre o gênero *Anabaenopsis* realizados por Taylor (1932), Singh (1962) e Jeeji-Bai *et al.* (1977) constatou-se que havia diferenças no desenvolvimento dos heterócitos. Seenayya e Subba Raju (1972) propuseram um novo gênero *Cylindrospermopsis*, o qual se separava de *Anabaenopsis* pelo desenvolvimento apical dos heterócitos. Ambos os gêneros, *Anabaenopsis* e *Cylindrospermopsis* apresentam uma divisão celular desigual antes da formação do heterócito, no entanto, em *Cylindrospermopsis* os heterócitos desenvolvem-se a partir de células apicais, enquanto em *Anabaenopsis* desenvolvem-se intercalados por duas células vizinhas. Desse modo, *Cylindrospermopsis raciborskii* tornou-se a espécie tipo e *Anabaenopsis raciborskii* tornou-se sinonímia (KOMÁREK e HAUER, 2008; KOMÁRKOVÁ, 1998; PADISÁK, 1997).

A produção de heterócitos em *C. raciborskii* está ligada a diversos fatores, entre eles a baixa concentração de nitrogênio inorgânico (amônio) no ambiente, pois a espécie requer uma concentração limite muito mais baixa em relação às outras

cianobactérias, o que acarreta vantagens competitivas e possibilita a sua dominância no sistema aquático (PADISÁK, 1997).

Florações de *C. raciborskii* têm sido comuns nas últimas décadas e podem ser acompanhadas pela produção de cianotoxinas. Em 1979 um surto de hepatointerite em Palm Island, Queensland, Austrália, ocasionou a hospitalização de 148 pessoas, a maioria crianças. Este incidente ocorreu após o tratamento de um reservatório de abastecimento público com sulfato de cobre, substância utilizada para controlar florações e que provoca a lise celular. Estudos posteriores provaram que a espécie *C. raciborskii*, encontrada no reservatório, era produtora de uma hepatotoxina, a cilindrospermopsina (HAWKINS et al. 1985; OHTANI et al. 1992).

C. raciborskii pode produzir mais de um tipo de metabólito secundário tóxico e esta habilidade parece estar relacionada à distribuição geográfica (WIEDNER et al. 2007). Linhagens australianas, européias e tailandesas caracterizam-se por produzirem cilindrospermopsina (HAWKINS, 1985 ; LAGOS et al., 1999; SAKER e GRIFFITHS, 2000; LI et al. 2001; MOLICA et al., 2002; FASTNER et al., 2003; NEILAN et al., 2003; CHONUDONKUL et al., 2004; MANTI et al., 2005; FASTNER et al., 2007), enquanto linhagens francesas produzem outro composto tóxico ainda não identificado (BERNARD et al. 2003). Lagos et al. (1999) relataram pela primeira vez a produção de saxitoxinas por linhagens brasileiras de *C. raciborskii* coletadas em reservatórios do estado de São Paulo. As variantes de saxitoxina encontradas foram neosaxitoxina GTX-2 e GTX-3.

Recentemente, descobriu-se que não há correlação entre fenótipo tóxico e associação filogenética em linhagens de *C. raciborskii* australianas. Análises do gene 16S rRNA e da respectiva seqüência do ITS1 (*internally transcribed spacer*) mostraram uma evolução independente de cada *operon* ribossomal. Os genes envolvidos na via biossintética da cilindrospermopsina estiveram presentes em um locus e apenas nas linhagens hepatotóxicas, demonstrando uma organização genômica comum e ausência de genes com mutação ou inativação biossintética nas linhagens não tóxicas. Portanto, é provável que os genes envolvidos na toxicidade de *C. raciborskii* sejam obtidos pelo processo da transferência horizontal, ao invés da evolução convergente (STUCKEN et al. 2009).

Figueiredo et al. (2007) sugeriram que a dominância ecológica de *C. raciborskii* também pode ser explicada por interações antagônicas com outras espécies fitoplanctônicas devido a produção de compostos alelopáticos. Eles

comprovaram que a maioria das espécies testadas foi sensível a exsudatos de *C. raciborskii*, os quais apresentaram fortes efeitos inibitórios na capacidade fotossintética.

C. raciborskii é a espécie mais comum do gênero. Inicialmente descrita como uma espécie de distribuição pantropical e subtropical tem sido cada vez mais freqüentes os relatos de sua dispersão para as regiões temperadas (KOMÁREK e KOMÁRKOVÁ, 2003 apud KOMÁREK e HAUER, 2008; PADISÁK, 1997). A espécie desenvolve-se em ambientes muito diferentes, desde reservatórios oligotróficos a lagos rasos e hipereutróficos e até mesmo em rios. Estes locais representam uma diversidade ampla de habitats, em termos geomorfológicos e de composição química da água, indicando um alto nível de adaptação ecofisiológica de *C. raciborskii* (PADISÁK, 1997).

Segundo Bittencourt-Oliveira e Molica (2003), *C. raciborskii* caracteriza-se por apresentar uma extensa plasticidade fenotípica que se reflete em tricomas retos, sigmóides e espiralados, ocorrendo em um mesmo corpo d'água. Horecká e Komárek (1979 apud KOMÁREK e HAUER 2008) afirmaram que o morfotipo espiralado nunca foi encontrado na Europa, ocorrendo apenas na Austrália. *C. raciborskii* com morfologia espiralada também foi encontrada nos Estados Unidos, na Tailândia, no Japão e no Egito (CHAPMAN e SCHELSKE 1997; CHONUDOMKUL et al. 2004, MOHAMED, 2007). Até o momento, populações brasileiras de *C. raciborskii* com tricomas espiralados foram descritas apenas para a região nordeste (BOUVY et al. 1999, 2000; FERREIRA 2002).

Alguns estudos têm apontado diferenças ecológicas importantes entre morfotipos reto e espiralado. Fabbro e Duivenvoorden (1996) analisaram populações de *C. raciborskii* do nordeste da Austrália com ambos os morfotipos e observaram a ingestão por *Brachionus angularis* Gosse. Estes rotíferos fixam-se às extremidades dos tricomas de ambas as formas, mas só conseguem ingerir o morfotipo reto, possivelmente devido à natureza espiralada do tricoma. Portanto, é possível que o espiralamento do tricoma seja uma estratégia para evitar a herbivoria na presença de rotíferos e provavelmente de outros componentes do zooplâncton.

Padisák et al. (2003) criaram modelos de algas confeccionados em PVC (policloreto de vinila) para estudar a resistência da morfologia nas propriedades de sedimentação (*sinking*) em meio fluido de glicerina. Constataram que a razão comprimento/largura das formas cilíndricas tem uma relação positiva com a

resistência à sedimentação, embora se deva considerar a posição horizontal do cilindro na coluna d'água, e a diminuição da resistência com o espiralamento. Pouco se sabe sobre as vantagens ecológicas do espiralamento embora, seja aparente a diminuição da resistência à sedimentação e o aumento da resistência à herbivoria (PADISÁK et al. 2003).

Medidas de características morfológicas de plantas e animais podem ser usadas como índices na comparação de nichos (ODUM, 1988). Segundo Ferreira et al. (2002) os morfotipos de *C. raciborskii* apresentam pequenas diferenças nas respostas às variáveis ambientais que podem significar alguma diversificação de nichos. Estes autores constataram que o morfotipo espiralado foi mais abundante no período com circulação mais freqüente e o morfotipo reto no período com estratificação mais duradoura. Além disso, uma queda de 2°C no ambiente estudado, em virtude do início do inverno, provocou o declínio de formas retas e conseqüente dominância de formas curvas de *C. raciborskii*.

Segundo Saker et al. (1999), não foi constatada nenhuma tendência na abundância relativa de morfotipos reto e espiralado de *C. raciborskii* com relação às diferentes profundidades em populações australianas. Embora a variação da temperatura no reservatório Solomon Dam, na Austrália, tenha sido pouco significativa (30,1°C em 10 m; 30,7°C em 3 m) dados sobre diferenças na intensidade luminosa em diferentes profundidades não foram disponibilizados.

Embora estudos ecofisiológicos sobre o comportamento dos morfotipos de *C. raciborskii* em condições controladas e naturais sejam escassos, o uso de ferramentas moleculares através da análise de seqüências genéticas tem demonstrado alta similaridade entre as formas reta e espiralada.

Saker et al. (1999) e Wilson et al. (2000) estudaram linhagens australianas de *C. raciborskii* com morfotipos reto e espiralado através de seqüências do gene 16S rRNA, as quais não separaram os morfotipos. Neilan et al. (2003) e Gugger et al. (2005) também utilizaram seqüências do 16S rRNA para investigar a filogenia de linhagens de diferentes países e encontraram altos valores de similaridade entre as mesmas.

Seqüências do gene *rpoC1* também mostraram alta similaridade genética entre morfotipos reto e espiralado e entre linhagens de diferentes países (GUGGER et al. 2005; HAANDE et al. 2008; WILSON et al. 2000). Segundo Wilson et al. (2000), 99-100% de identidade genética foi observada entre linhagens de *C.*

raciborskii australianas e brasileiras com morfotipos reto e espiralado, indicando que pertençam à mesma espécie. Embora Gugger et al. (2005) e Haande et al. (2008) tenham encontrado alta similaridade entre linhagens provenientes da Europa, África e Austrália, com exceção das linhagens americanas, utilizando seqüências do *rpoC1*, seqüências do gene *nifH* e espaçador interno transcrito 1 (ITS1) separaram linhagens de *C. raciborskii* de diferentes continentes em três grupos bem definidos: australiano-africano, europeu e americano (GUGGER et al. 2005; HAANDE et al. 2008).

Dyble et al. (2002) e Bittencourt-Oliveira e Molica (2003) utilizaram seqüências do espaçador intergênico do operon da ficocianina (*cpcBA*-IGS) para analisar linhagens de *C. raciborskii* de diferentes países e com ambos os morfotipos. Estes autores concluíram que as linhagens de diferentes continentes possuem alta similaridade genética entre si. As linhagens estudadas por Dyble et al. (2002) separaram-se em três agrupamentos, sendo estes, europeu-australiano (com linhagens reta e espiralada), americano (linhagens brasileiras e norte-americanas com morfotipo reto) e norte-americano (com morfotipo espiralado). Bittencourt-Oliveira e Molica (2003) encontraram um agrupamento europeu-australiano e um agrupamento americano (ambos com linhagens reta e espiralada).

Seqüências repetitivas como STRR (*short-sequence tandem repeat region*) e HIP1 (*highly iterated palindrome*) também demonstraram alta similaridade genética entre morfotipos reto e espiralado de *C. raciborskii* (CHONUDOMKUL et al. 2004; NEILAN et al. 2003; SAKER e NEILAN 2001; WILSON et al. 2000), sendo que linhagens com morfotipo espiralado foram agrupadas utilizando-se seqüências STRR (WILSON et al. 2000). Seqüências de HIP1 demonstraram ser mais sensíveis na detecção da heterogeneidade de linhagens de *C. raciborskii* indicando que ambos os morfotipos pertençam à mesma espécie, o que permitiu concluir que a morfologia é uma característica que não está necessariamente ligada à filogenia de *Cylindrospermopsis* (SAKER e NEILAN 2001).

1.3. A influência da luz e da temperatura na fisiologia de cianobactérias

As cianobactérias desenvolveram várias adaptações ecofisiológicas e morfológicas que permitiram o melhor aproveitamento da luz e da temperatura nos sistemas aquáticos, parâmetros físicos de extrema importância ao seu

desenvolvimento, possibilitando vantagens competitivas em relação aos demais componentes do fitoplâncton.

A formação de florações está relacionada com a superior habilidade de captura da luz mesmo quando o auto-sombreamento é grande e, também, com a capacidade de regular a posição na coluna d'água em busca de áreas mais ricas em nutrientes e/ou luz, graças à flutuabilidade proporcionada pelos aerótopos.

Populações de *C. raciborskii* desenvolvem-se, geralmente, em águas quentes ($> 25^{\circ}\text{C}$), independente da latitude, mantendo populações densas durante todo o ano nas regiões tropicais e, restringindo-se a períodos curtos nas regiões temperadas durante o verão. A necessidade de altas temperaturas está relacionada, em parte, à germinação dos acinetos, que varia entre $22\text{-}23,5^{\circ}\text{C}$ (PADISÁK 1997).

Komárková et al. (1999) constataram que alterações na morfologia do tricoma podem também estar relacionadas à temperatura. Observaram ainda que células cilíndricas e tricomas com heterócitos apareceram durante as temperaturas mais altas ($> 20^{\circ}\text{C}$) e que células alongadas, finas e tricomas sem heterócitos surgiram com as temperaturas mais baixas ($< 20^{\circ}\text{C}$).

C. raciborskii é tolerante ao sombreamento devido à adaptação cromática, i.e., capacidade de aumentar a amplitude de absorção do espectro luminoso através do aumento na concentração de pigmentos acessórios, especialmente ficobiliproteínas e xantofilas. A fotossíntese de táxons tolerantes à sombra inibe-se a intensidades luminosas menores que $200\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sendo que linhagens de *C. raciborskii* em condições de cultivo alcançaram o crescimento máximo a $121\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PADISÁK 2004).

McCausland et al. (2005) estudaram a influência da luz em uma linhagem de *Anabaena circinalis* em condições controladas com variação entre $18\text{-}450\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sob temperatura constante de 20°C . A intensidade luminosa necessária para o crescimento máximo foi de $22\pm 7\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, comprovando que esta espécie também é tolerante às baixas intensidades luminosas.

Estudos recentes têm demonstrado estreita relação entre a habilidade de dispersão de *C. raciborskii* para as regiões temperadas e as mudanças climáticas globais. Segundo Briand et al. (2004), *C. raciborskii* pode ser classificada como uma espécie tropical bastante tolerante, capaz de tirar vantagens do progressivo aumento da temperatura da água em regiões temperadas na primavera para se proliferar

durante o verão. Além disso, também possui a capacidade de se sobrepujar frente às espécies fitoplanctônicas nativas.

Alguns autores têm previsto a invasão de *C. raciborskii* para as regiões temperadas, bem como o aumento da frequência de florações nas próximas décadas. Para Padisák (1997) e Briand et al. (2004), essa espécie deverá se proliferar em lagos rasos na Europa dependendo da velocidade de adaptação às águas mais frias. Nos últimos anos, relatos de novas ocorrências de *C. raciborskii* foram publicados para Portugal (SAKER et al. 2003), Argélia (BOUIACHA e NASRI 2004), Itália (MANTI et al. 2005) e Egito (MOHAMED 2007).

Segundo Wiedner et al. (2007), a antecipação de 30 dias na germinação dos acinetos pode duplicar o tamanho da população. Portanto, o início precoce da primavera em regiões temperadas, em virtude do aquecimento global, poderá aumentar a sua dispersão para estas regiões, bem como, o tamanho populacional e os conseqüentes problemas ecológicos advindos das florações de *C. raciborskii*.

1.4. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar os efeitos de duas diferentes intensidades luminosas e temperaturas no crescimento e na morfologia dos tricomas de linhagens reta e espiralada através do ajuste de curvas logísticas triparamétricas às curvas de crescimento;
- Aceitar ou rejeitar a hipótese de que a forma espiralada tende a ser mais susceptível à intensidade luminosa e temperatura altas, devido à sua conformação espacial;
- Aceitar ou rejeitar a hipótese de que ambas as formas respondam negativamente à intensidade luminosa e temperatura altas em condições de cultivo, visto que em condições naturais é possível a realização de migrações verticais buscando estratos mais adequados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagens e condições de cultivo

Foram utilizadas duas linhagens clonais, sendo uma com morfologia espiralada (ITEP31) e outra reta (ITEP28). As linhagens foram isoladas em corpos d'água no estado de Pernambuco e mantidas em câmaras climáticas na Coleção Brasileira de Cianobactérias da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (BCCUSP: Brazilian Cyanobacteria Collection - University of São Paulo) (Tabela 1) sob condições controladas de luz ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (14:10 horas, claro-escuro) e temperatura ($21^\circ\text{C} \pm 0,5$), em meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al. 1979) modificado segundo Bittencourt-Oliveira (2000) pela substituição de citrato férrico de amônio por cloreto férrico hexahidratado, em pH 7,8.

Tabela 1. Linhagens utilizadas de *Cylindrospermopsis raciborskii*. ITEP: Instituto Tecnológico de Pesquisa do Estado de Pernambuco.

Linhagem	Data de coleta	Localidade	Coordenadas	Morfologia
ITEP28	24/09/2002	Lagoa ornamental do ITEP, Recife, PE	8°03'32"S, 34°56'53"W	Reta
ITEP31	19/09/2002	Lagoa ornamental do ITEP, Recife, PE	8°03'32"S, 34°56'53"W	Espiralada

2.2. Obtenção das curvas de crescimento

Pré-culturas foram preparadas em erlenmeyers de 250 ml previamente aclimatados por 30 dias nas mesmas condições destinadas à obtenção das curvas de crescimento. Após o período para aclimação, o número de tricomas. ml^{-1} em cada linhagem foi quantificado e, então, inoculado nos erlenmeyers definitivos.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers com capacidade para 3 l contendo 2,2 l de meio de cultivo BG-11, pH 7,8, com réplicas para cada linhagem. O volume de meio de cultivo necessário para cada experimento combinado de

intensidade luminosa e temperatura foi preparado de uma única vez, de maneira que ambas as linhagens e suas réplicas contivessem o mesmo meio e pH.

Após a inoculação das linhagens, os cultivos para cada morfotipo foram mantidos nas seguintes condições: intensidade luminosa de 30 e 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medidas com fotômetro LI-COR equipado com sensor esférico, mod. LI-250, mergulhado em água na exata posição em que estariam localizados os erlenmeyers, combinadas com temperaturas de 21 e 31°C; fotoperíodo 14:10 horas (claro-escuro) e, 2,2 l de meio de cultivo BG-11 (Tabela 2).

Tabela 2. Condições de luz e temperatura utilizadas em cada experimento, com meio de cultivo BG-11, pH 7,8, fotoperíodo 14:10 horas (claro:escuro) para as linhagens ITEP28 (n=2) e ITEP31 (n=2). a. ITEP28. b. ITEP31.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Temperatura (°C)	21	31	21	31
Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	30	30	90	90
Densidade dos inóculos (tricomas.ml⁻¹)	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴ (a); 10 ⁵ (b)	10 ⁴

A intensidade luminosa de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, considerada mais alta, foi escolhida após a realização de um experimento piloto utilizando uma intensidade luminosa de 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sob a qual as linhagens reta (ITEP28) e espiralada (ITEP31) não se desenvolveram.

2.3. Análise morfológica

As análises morfológicas foram realizadas a partir de medidas das células vegetativas (n=400), heterócitos (n=100 a 200) e acinetos (n=60 a 150). Essas medidas foram tomadas através de microscópio binocular Nikon (Nikon E200, Melville, NY, USA) com uma ocular de medição acoplada ao sistema. Realizou-se cálculos da média e desvio padrão das larguras e comprimentos celulares utilizando

o programa Microsoft Excel (Microsoft Office 2007) nas quatro condições testadas e os resultados representados em gráficos produzidos no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al. 2005).

A fotodocumentação foi realizada de amostras frescas e preservadas utilizando-se o programa ImageLab (Softium, SãoPaulo, Brazil) acoplado ao microscópio óptico Nikon com câmera digital acoplada (Samsung SCC833, Tokyo, Japan). Esses procedimentos foram repetidos para todas as amostras retiradas periodicamente.

2.4. Contagem

O crescimento foi estipulado a partir de contagens de tricomas de alíquotas (4 ml) retiradas periodicamente em condições assépticas após homogeneização dos cultivos, preservadas com lugol acético a 10% e armazenadas. Os tricomas para cada dia de amostra retirada foram contados em câmara Fuchs-Rosenthal com auxílio de microscópio Nikon (Nikon E200, Melville, NY, USA) e um número mínimo de 400 tricomas foi contado aleatoriamente, após sedimentação dos mesmos na lâmina, a fim de se obter um erro de aproximadamente 10% para um nível de confiança de 95% (GUILLARD 1973).

2.5. Análise dos dados referentes às curvas de crescimento

Após a contagem, o número de tricomas encontrados para cada dia de amostra foi ajustado pela seguinte expressão deduzida a partir de um modelo de crescimento logístico com três parâmetros:

$$y = \frac{\phi_1}{1 + \exp(\phi_2 - x/\phi_3)} \quad (1)$$

em que ϕ_1 é a assíntota horizontal, ou seja, o tamanho máximo que a população pode atingir quando transcorrer um período de tempo bastante longo ($x \rightarrow \infty$); ϕ_2 é o tempo para que a população atinja a metade do tamanho máximo, isto é, $\phi_1/2$; e ϕ_3 é um parâmetro de escala, inversamente proporcional à velocidade máxima de crescimento.

Para efeito de comparação dos tratamentos, foi calculada, adicionalmente, a velocidade instantânea de crescimento da população no tempo $x = \phi_2$, dada por $\phi_1/(4\phi_3)$, e que corresponde à velocidade máxima.

Uma forma mais completa de analisar o crescimento é através do comportamento das velocidades para todos os tempos de observação. Embora essa medida não tenha sido realizada diretamente, a análise dos dados via equação logística, e depois o cálculo da derivada temporal dessa equação, permitiu obter as velocidades “dia a dia”, $V(x)$, que não podem ser realizadas por observação experimental direta. Deste modo, curvas de velocidade de crescimento foram obtidas derivando no tempo (x) a expressão (1) da qual se obteve: $V(x) = dy/dx = V(x) = (\phi_1/\phi_3) \cdot (\exp[(\phi_2 - x)/\phi_3] / \{1 + \exp[(\phi_2 - x)/\phi_3]\})^2$.

Os gráficos foram confeccionados nos programas Microsoft Excel (Microsoft Office 2007) e OriginPro 7.5 (OriginLab, Massachusetts, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia

As medidas de largura (mínima, média e máxima) das células vegetativas, heterócitos e acinetos, assim como o desvio padrão, para ambas as linhagens a 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C, 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C, 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C e 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C encontram-se nas Tabela 3 e 4 e Fig. 1 e 2. A morfologia apresentada pelas linhagens reta (ITEP28) e espiralada (ITEP31), bem como as alterações sofridas durante os experimentos encontram-se nas Fig. 3-6.

A intensidade da variação nos valores (μm) de comprimento das células vegetativas de ambas as linhagens é maior que a dos valores de largura (Fig. 1). A linhagem reta (ITEP28) apresentou maior variação na largura na condição de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C, enquanto a linhagem espiralada (ITEP31) apresentou na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (Fig. 1). Para ambas as linhagens a menor variação nos valores de largura ocorreu na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C (Fig. 1). Não houve diferenças significativas entre os valores de comprimento para ambas as linhagens nas diferentes condições testadas (Fig. 1).

Os valores de largura de heterócitos da linhagem reta (ITEP28) estiveram bem próximos em todas as condições em que ocorreram (Fig. 2). A linhagem espiralada (ITEP31) apresentou amplitude de variação menor nos valores de largura dos heterócitos na condição de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C, e maior na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (Fig. 2). Também não houve diferenças marcantes nos valores de comprimento de heterócitos para ambas as linhagens nas condições testadas (Fig. 2).

Os acinetos apresentaram pouca variação nos valores de largura para a linhagem reta (ITEP28) (Fig. 2). A linhagem espiralada (ITEP31) apresentou maior amplitude de variação nos valores de largura na condição de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C, e menor na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C (Fig. 2). Não houve diferenças significativas nos valores de comprimento de acinetos para ambas as linhagens nas condições testadas (Fig. 2).

Os heterócitos foram encontrados nas duas extremidades dos tricomas ou, mais freqüentemente, em uma só. Apresentaram formas cônicas, levemente arredondadas ou lanceoladas (Fig.3a, b, c e 4a, b, d). Para a linhagem reta (ITEP28)

a ausência de heterócitos só ocorreu na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . Nas outras condições eles estiveram presentes pelo menos até o fim da fase exponencial. Para a linhagem espiralada (ITEP31) a presença de heterócitos ocorreu em todas as condições até o fim da fase exponencial, embora na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C tenham aparecido apenas no início da curva. Na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C os heterócitos estiveram presentes durante toda a curva de crescimento.

Os acinetos foram encontrados entre a porção mediana do tricoma e sua extremidade, mais próximos dos heterócitos, em número de um até quatro acinetos em um único tricoma. Os acinetos apresentaram-se arredondados e levemente cilíndricos (Fig. 3b, d e 4c). A linhagem espiralada (ITEP31) só não produziu acinetos na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C , enquanto a linhagem reta (ITEP28) não produziu nas condições de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C e $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . Os acinetos estiveram presentes em ambas as linhagens, geralmente, até a metade da fase exponencial e o seu número foi maior quando houve quedas no crescimento.

Alterações morfológicas ocorreram em todas as condições testadas para ambas as linhagens (Fig. 5-6). Nas condições de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C a linhagem espiralada (ITEP31) tornou-se reta e sigmóide (Fig. 6b), e em $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C , essa linhagem (ITEP31) que começou a curva de crescimento reta retornou a sua forma espiralada. Estas alterações para o morfotipo espiralado ocorreram gradualmente ao longo do crescimento populacional e, embora nenhuma alteração drástica no morfotipo reto (ITEP28) tenha sido observada, tricomas muito longos e finos foram encontrados na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (Fig. 5c). Tricomas mais finos na fase estacionária também foram observados em todas as condições testadas.

Para a linhagem espiralada (ITEP31), tanto a $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C quanto a $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C , houve aumento no número de tricomas espiralados no meio da fase exponencial, pois, até aquela fase, grande parte apresentou-se reto e sigmóide.

Outras alterações, como células constrictas (Fig. 5a e 6a), extremidades dos tricomas bifurcadas (Fig. 5b e 6c), tricomas finos e alongados (Fig. 5c e 6d), diferenças na largura das células de um mesmo tricoma (Fig. 5c), foram observadas em ambas as linhagens e ocorreram principalmente no final da fase exponencial, o que é bastante comum em cultivos velhos.

Para ambas as linhagens a variação na morfologia foi grande ao longo de todos os experimentos, apresentando-se tricomas curtos, médios e longos, retos, curvos, sigmóides e espiralados, células finas e largas, curtas e compridas, embora predominem sempre tricomas médios, retos e com células mais finas para a linhagem reta (ITEP28) e, tricomas médios, espiralados, sigmóides ou retos e com células mais largas para a linhagem espiralada (ITEP31).

3.2. Curvas de crescimento e velocidade

As estimativas dos parâmetros do modelo logístico e as velocidades de crescimento sob os diferentes tratamentos, bem como os respectivos coeficientes de determinação (R^2) encontram-se na Tabela 5. As curvas de crescimento para ambas as linhagens (ITEP28 e ITEP31) nas condições descritas no item anterior, encontram-se na Fig. 7. Os valores de velocidade máxima de crescimento comparados entre ambas as linhagens, em todas as condições testadas, encontram-se na Fig. 8, enquanto as curvas de velocidade estão na Fig.9.

As maiores velocidades de crescimento ($V(x) = 3,21; 3,63; 3,89$) ocorreram para a linhagem reta (ITEP28) (Tabela 5). A linhagem espiralada (ITEP31) apresentou velocidades de crescimento menores ($V(x) = 0,97; 1,07; 1,61; 1,80$). Na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C a linhagem reta não apresentou velocidade de crescimento adequada ao seu desenvolvimento ($V(x)=0,31$) (Tabela 5, Fig. 9b).

O crescimento máximo tanto para a linhagem reta (ITEP28) quanto para a linhagem espiralada (ITEP31) ocorreu bem próximo aos 100 dias, após o início da curva, com exceção da linhagem espiralada na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (63,9 dias). As velocidades de crescimento, em todos os casos, aumentaram rapidamente com o transcorrer dos dias (fase de aceleração do crescimento), atingindo um máximo (saturação do crescimento) e depois diminuíram rapidamente (desaceleração do crescimento), e assintoticamente tenderam a zero, ou seja, houve a interrupção do crescimento.

Na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C (Fig. 9a) o tempo metabólico foi o mesmo para ambas as linhagens, pois o início da fase de aceleração, a saturação e o fim da desaceleração do crescimento ocorreram com sincronia tanto para a linhagem reta quanto para a linhagem espiralada, sendo que as velocidades de crescimento no início da fase de aceleração e no fim da desaceleração foram iguais.

No entanto, a linhagem reta apresentou valores de velocidade máxima (crescimento máximo) muito maiores do que os da linhagem espiralada.

Em $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C (Fig. 9b) o tempo metabólico foi muito próximo para as linhagens reta (ITEP28) e espiralada (ITEP31), com um pequeno atraso da linhagem espiralada para atingir a velocidade máxima de crescimento, sendo que também neste caso suas velocidades de crescimento foram menores quando comparadas com a linhagem reta (ITEP28). Na Fig. 9b foi inserida a curva de velocidade da linhagem reta na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C para efeito de comparação. Nota-se que nesta condição esta linhagem não apresentou a fase de aceleração do crescimento e nem foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento, apresentando um declínio contínuo desde o início do experimento.

Na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (Fig. 9c) a linhagem espiralada (ITEP31) apresentou um tempo metabólico mais rápido em relação a linhagem reta (ITEP28) atingindo a saturação do crescimento com cerca de 30 dias de antecedência. A velocidade de crescimento para ambas as linhagens se igualou próximo dos 50 dias após o início do crescimento, no entanto, a linhagem espiralada (ITEP31) logo atingiu a saturação de crescimento e a linhagem reta (ITEP28) continuou a crescer atingindo velocidades de crescimento maiores. A curva de velocidade de crescimento da linhagem espiralada (ITEP31) na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C (Fig. 9c) mostrou que a mesma também não se desenvolveu bem nesta condição demorando para atingir a saturação do crescimento (163,5 dias) e a curva foi, então, interrompida antes do fim da fase de desaceleração.

4. DISCUSSÃO

Em condições de cultivo é possível selecionar e controlar as variáveis que atuam sobre o desenvolvimento de uma população e, deste modo, inferir quais os parâmetros que afetam o desenvolvimento populacional do organismo analisado. A extrema plasticidade fenotípica de *C. raciborskii* já foi observada por diversos autores (BOUVY 1999; KOMÁRKOVÁ et al. 1999, FERREIRA 2002; SHAFIK et al. 2003) em condições controladas de cultivo e na natureza, admitindo-se que a razão para as alterações na morfologia deva estar relacionada aos fatores bióticos e abióticos (BOUVY 1999; KOMÁRKOVÁ et al. 1999, FERREIRA 2002; SHAFIK et al. 2003). Além disso, entender a dinâmica populacional dos diferentes morfotipos de *C. raciborskii* permite prever as condições favoráveis à proliferação e ao estabelecimento desta espécie potencialmente tóxica, principalmente em reservatórios de água para consumo, e os conseqüentes riscos ecológicos.

Os valores de largura média das células vegetativas apresentados por ambas as linhagens em todas as condições testadas corresponderam àqueles da descrição original de *C. raciborskii*: 2,5-4,0 μm (WOLOSZYNSKA 1912 apud CRONBERG e KOMÁREK 2003) (Fig. 1). Nas condições de temperatura alta (31 °C) ambas as linhagens apresentaram variação menor nos valores de largura, enquanto nas condições de temperatura baixa (21 °C) a variação foi maior (Fig. 1). Apesar de a morfometria celular ter sido semelhante entre ambas as linhagens, o morfotipo espiralado (ITEP31) foi ligeiramente mais largo que o morfotipo reto. As medidas de comprimento celular para ambas as linhagens em todas as condições testadas estiveram muito próximas e, portanto, não foram consideradas um parâmetro apropriado para comparações taxonômicas.

Saker et al. (1999) constataram que a temperatura de 21 °C, além de prejudicar o desenvolvimento populacional de linhagens reta e espiralada de *C. raciborskii* provenientes da Austrália, também proporcionou alterações na morfologia dos tricomas como constrições na parede celular seguidas por fragmentação em células individuais. Komárkova et al. (1999) concluíram que a temperatura tem grande influência na morfologia de linhagens brasileiras de *C. raciborskii*, as quais apresentaram formas anômalas (células alongadas, tricomas constritos, irregularmente curvos e sem heterócitos) durante as temperaturas mais baixas (<20 °C).

As medidas de comprimento celular de células vegetativas para ambas as linhagens foram muito semelhantes entre si nas diferentes condições de intensidade luminosa e temperatura testadas. O mesmo foi observado para os heterócitos e acinetos. Portanto, estas medidas também não foram consideradas um parâmetro apropriado para comparações.

Após o experimento a $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C a linhagem espiralada (ITEP31), que havia se tornado gradualmente reta e sigmóide, foi submetida ao meio de cultivo ASM1 e retornou ao morfotipo espiralado. Na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C também houve a alteração gradual na morfologia reta para espiralada para esta linhagem. Alterações na morfologia do tricoma não foram observadas para o morfotipo reto (ITEP28). Nota-se, portanto, que a linhagem espiralada, apresenta plasticidade fenotípica maior que a linhagem reta. É provável que a linhagem espiralada mantenha essa dinâmica morfológica em resposta às condições ambientais. No presente estudo não é possível concluir qual parâmetro testado, intensidade luminosa ou temperatura, provocou as mudanças na morfologia, pois, embora as alterações tenham ocorrido numa intensidade luminosa baixa ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), as velocidades de crescimento maiores corresponderam as condições combinadas de intensidade luminosa e temperatura altas e intensidade luminosa e temperatura baixas.

A linhagem reta (ITEP28) apresentou uma tendência ao afilamento e alongamento dos tricomas na fase estacionária de crescimento. Observações semelhantes também foram feitas por Hawkins et al. (2001) que constataram uma diminuição progressiva na largura das células de $5 \mu\text{m}$, no início do experimento, para $2,5 \mu\text{m}$ na fase estacionária. Eles concluíram que a diminuição na disponibilidade de luz, em virtude do auto-sombreamento provocado pelo aumento da biomassa, propicia mudanças nas medidas dos tricomas. O comprimento do tricoma e o volume das células vegetativas modificam a distribuição de pigmentos na célula aumentando a eficiência na utilização da luz.

Segundo Shafik et al. (2003), se a concentração de nutrientes for baixa os tricomas começam a apresentar anomalias morfológicas para continuar utilizando os nutrientes disponíveis eficientemente. Neste estudo, tricomas anômalos foram observados com maior frequência durante a fase estacionária quando ocorre a depleção de nutrientes no meio. Komárková et al. (1999) também constataram que tricomas de *C. raciborskii* apresentando anomalias em baixas concentrações de

nutrientes e em condições naturais, voltaram a apresentar morfologia normal (células cilíndricas, filamentos curtos e retos, sem constrição, heterócitos em ambas as extremidades e presença de acinetos) após serem inoculados em meio de cultivo com concentrações ótimas de nutrientes.

A largura média dos heterócitos apresentou-se maior que aquela apresentada na descrição original de *C. raciborskii*: 2,0-2,5 μm (WOLOSZYNSKA 1912 apud CRONBERG e KOMÁREK 2003) (Fig. 2). Na condição de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C a variação nas medidas de largura dos acinetos da linhagem espiralada (ITEP31) foi muito grande, sugerindo que esta condição não favoreceu a morfologia destas células.

A produção de acinetos para o morfotipo reto ocorreu apenas nas condições de temperatura alta (31°C). Para a linhagem com morfotipo espiralado, não houve produção de acinetos apenas na condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C. Foi observado também que a produção de acinetos iniciou-se a cada vez que houve uma queda no crescimento, para ambas as linhagens. Embora a produção de acinetos seja uma estratégia de sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis, costuma ocorrer com maior frequência em regiões temperadas. Nos trópicos a principal estratégia para que a população se mantenha em condições desfavoráveis é a alteração na forma dos tricomas, visto que não há grande variação de temperatura ao longo do ano (KOMÁRKOVÁ et al. 1999).

É provável que as condições de cultivo tenham influenciado a produção de acinetos após as quedas no crescimento, possibilitando que as linhagens continuassem a se desenvolver. Moore et al. (2004) sugerem que temperatura e quantidade de fósforo elevados estão envolvidos com a diferenciação de acinetos, Shafik et al. (2003) sugerem, no entanto, que a diferenciação de acinetos pode não depender de quantidades elevadas de fósforo mas sim de altas temperaturas, o que pode explicar a ausência de acinetos nas condições de temperatura mais baixa (21°C).

A produção de heterócitos para ambas as linhagens e para todas as condições testadas ocorreu até o fim da fase exponencial, a partir da qual começa a diminuir, com exceção da condição de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C onde não houve produção de heterócito para o morfotipo reto e produção apenas no início da curva, para o morfotipo espiralado. Sabe-se que a fixação de nitrogênio é um processo que consome bastante energia e que espécies da ordem Nostocales requerem altas

intensidades luminosas para manter as taxas de crescimento enquanto fixam nitrogênio (McCAUSLAND et al. 2005, WIEDNER et al. 2007). Entretanto, Padisák (1997) afirma que a produção de heterócitos ocorre quando há deficiência de nitrogênio no ambiente e a presença destas células indicaria o processo de fixação de nitrogênio. Em nosso estudo, o meio de cultivo utilizado para o experimento de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C foi o mesmo para as demais condições, portanto, a ausência de heterócitos nesta condição não deve estar relacionada a concentração de nutrientes e sim a condição combinada de temperatura baixa e intensidade luminosa alta desfavoráveis ao desenvolvimento da linhagem reta.

A intensidade da variação nos valores de largura para ambas as linhagens parece estar relacionada aos valores de velocidade máxima de crescimento. Quando a velocidade de crescimento foi maior a variação nos valores de largura média foi menor e vice versa, por exemplo: na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C a velocidade de crescimento da linhagem reta (ITEP28) foi de 3,89 e o desvio padrão para a largura das células vegetativas foi 0,44, enquanto na condição de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C a velocidade de crescimento foi 3,21 e o desvio padrão foi 1,15. Isto indica que a morfologia dos tricomas, assim como o crescimento populacional, também é afetada pelas diferentes condições de cultivo.

As curvas de velocidade comparam-se a uma curva metabólica, na qual a fase de aceleração representa o catabolismo (geração de energia) e a fase de desaceleração, o anabolismo celular (consumo de energia). Estas curvas de velocidade permitiram uma observação mais precisa do que as curvas de crescimento, pois, mostraram o tempo exato (em dias) em que as linhagens reta (ITEP28) e espiralada (ITEP31) cresceram até atingir o tamanho máximo populacional e decresceram até chegar na fase estacionária.

A linhagem reta (ITEP28), se adaptou às condições testadas apresentando tempos metabólicos muito próximos e velocidades máximas de crescimento altas, com exceção da condição de intensidade luminosa alta ($90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura baixa (21°C) na qual a velocidade máxima de crescimento foi a menor ($V(x)=0,31$). Podemos afirmar que a temperatura de 21°C não foi adequada ao desenvolvimento do morfotipo reto quando combinada a intensidade luminosa alta ($90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), sendo que na condição de intensidade luminosa baixa ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a velocidade máxima de crescimento foi alta ($V(x)=3,21$). Além de prejudicar o crescimento populacional da linhagem reta, a condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C

não proporcionou a produção de heterócitos e acinetos, células especializadas com funções vitais ao estabelecimento de populações de *C. raciborskii* no ambiente.

Embora apresentando velocidades de crescimento menores do que o morfotipo reto, a linhagem espiralada (ITEP31) se desenvolveu bem em todas as condições testadas, apesar de ter demorado muito (163,5 dias) para atingir a velocidade máxima de crescimento na condição de $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . Nas condições de temperatura de 31°C , independente da intensidade luminosa, esta linhagem apresentou tempos metabólicos praticamente iguais com velocidades de crescimento adequadas ao desenvolvimento populacional. No entanto, nas condições de temperatura de 21°C a intensidade luminosa teve influência decisiva no tempo metabólico. Em $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C , o morfotipo espiralado atingiu a velocidade máxima de crescimento próximo ao dia 64 enquanto em $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C , próximo ao dia 164. Além disso, a velocidade de crescimento foi a menor ($V(x)=0,97$) nesta condição e a produção de acinetos não ocorreu.

Segundo Ferreira (2002), populações de *C. raciborskii* de um reservatório em Pernambuco correlacionaram-se positivamente com a temperatura, entre outros parâmetros, e negativamente com a disponibilidade de luz. Além disso, as formas retas e curvas coexistentes naquele ambiente variaram de maneira similar frente a fatores abióticos. Observou-se a que o morfotipo reto predominou durante a estação seca e o morfotipo espiralado, na estação chuvosa. No presente estudo, notou-se que houve também diferenças na dinâmica populacional de ambos os morfotipos de *C. raciborskii* nas diferentes condições testadas.

Uma vez que o estudo de seqüências genéticas através de ferramentas moleculares não sustente a separação dos morfotipos de *C. raciborskii* em espécies distintas, devem-se considerar as diferentes respostas ecofisiológicas entre os mesmos como conhecimento de extrema importância para a taxonomia do gênero *Cylindrospermopsis* e para o controle populacional destes organismos potencialmente tóxicos.

5. CONCLUSÕES

- a)** Os resultados encontrados contrariam a hipótese proposta de que ambos os morfotipos são susceptíveis a intensidade luminosa e temperatura altas em condições controladas, uma vez que ambos apresentaram as maiores velocidades de crescimento nesta condição. A condição que prejudicou o desenvolvimento das linhagens foi aquela com temperatura baixa e intensidade luminosa alta.
- b)** O morfotipo reto (ITEP28) se adaptou melhor do que o morfotipo espiralado (ITEP31) às condições testadas, apresentando velocidades de crescimento maiores. Além disso, alterações na morfologia do tricoma não foram observadas.
- c)** O morfotipo espiralado (ITEP31) apresenta grande plasticidade fenotípica alterando a morfologia do tricoma ao longo do crescimento populacional, sendo que esta capacidade pode estar relacionada às condições ambientais e/ou serem intrínsecas a dinâmica populacional desta linhagem.
- d)** Variações na morfometria celular bem como ausência de acinetos para ambas as linhagens estiveram relacionadas às condições de temperatura baixa (21 °C).
- e)** Ambas as linhagens se adaptaram às condições testadas, no entanto, os morfotipos responderam de maneiras diferentes às temperaturas e intensidades luminosas testadas: enquanto o morfotipo reto cresceu rápido e sem apresentar variações na morfologia do tricoma, o morfotipo espiralado apresentou velocidades de crescimento menores e variações na morfologia do tricoma ao longo dos experimentos.

Tabela 3. Tabela comparativa com as larguras, em μm , das células vegetativas ($n=400$), heterócitos ($n=100-200$) e acinetos ($n=60-150$) nas diferentes condições testadas. M: média; DP: desvio padrão; CV: célula vegetativa; H: heterócito; A: acinetos; -: ausente.

		30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C			30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C			90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C			90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C		
		M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP
ITEP28 (reto)	CV	3,04	7,80 – 1,30	1,15	3,51	5,00 – 2,00	0,78	2,79	5,20 – 0,52	0,76	3,12	4,55 – 2,50	0,44
	H	2,87	5,20 – 1,30	0,85	3,83	5,20 – 2,50	0,59	-	-	-	3,97	6,50 – 2,60	0,69
	A	-	-	-	5,12	5,20 – 3,90	0,25	-	-	-	5,09	5,20 – 3,90	0,31
ITEP31 (espiralado)	CV	2,70	5,20 – 1,30	0,50	4,08	5,00 – 2,50	0,59	3,24	5,20 – 1,30	1,18	3,75	4,55 – 2,60	0,42
	H	2,63	5,20 – 1,30	0,49	4,70	5,00 – 3,75	0,53	4,01	5,20 – 2,60	0,96	3,77	5,20 – 2,60	0,70
	A	4,17	5,20 – 2,60	1,00	5,16	6,25 – 2,00	0,70	-	-	-	5,07	6,50 – 3,90	0,46

Tabela 4. Tabela comparativa com os comprimentos, em μm , das células vegetativas ($n=400$), heterócitos ($n=100-200$) e acinetos ($n=60-150$) nas diferentes condições testadas. M: média; DP: desvio padrão; CV: célula vegetativa; H: heterócito; A: acineto; -:ausente.

		30μmol.m ⁻² .s ⁻¹ e 21°C			30μmol.m ⁻² .s ⁻¹ e 31°C			90μmol.m ⁻² .s ⁻¹ e 21°C			90μmol.m ⁻² .s ⁻¹ e 31°C		
		M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP	M	Máx-Mín	DP
ITEP28 (reto)	CV	7,95	15,60-3,90	0,96	8,08	12,50-5,00	1,69	7,55	15,60-7,80	1,99	9,26	10,40-5,00	2,21
	H	8,16	13,00-3,90	1,94	8,30	10,40-6,25	1,50	-	-	-	8,74	26,00-6,50	2,84
	A	-	-	-	15,91	24,70-13,00	2,84	-	-	-	15,92	26,00-13,00	2,95
ITEP31 (espiralado)	CV	8,01	18,20-5,20	0,90	9,00	15,00-6,25	1,75	7,91	15,60-2,60	2,35	8,90	10,40-5,20	0,73
	H	8,16	13,00-5,20	1,76	9,26	12,50-6,25	1,55	10,08	15,60-5,20	2,16	8,86	13,00-6,50	1,54
	A	15,89	26,00-10,40	3,06	16,48	20,00-16,25	3,23	-	-	-	14,64	16,90-10,40	3,21

Tabela 5. Estimativas dos parâmetros do modelo logístico, velocidade de crescimento sob os diferentes tratamentos e respectivos coeficientes de determinação (R^2). ϕ_1 : tamanho máximo da população após um período de tempo bastante longo ($x \rightarrow \infty$). ϕ_2 : tempo para que a população atinja a metade do tamanho máximo. ϕ_3 : parâmetro de escala, inversamente proporcional à velocidade máxima de crescimento.

Linhagem	Temperatura (°C)	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$)	ϕ_2 (dias)	$\phi_1 \times 10^6$ (tricomas)	ϕ_3	Velocidade máxima de crescimento (tricoma.dias ⁻¹ . 10^4)	R^2
ITEP28 (reto)	21	30	92,7	2,87	22,34	3,21	0,98
		90	1,20	0,75	60,21	0,31	0,97
	31	30	98,4	2,63	18,12	3,63	0,99
		90	90,1	4,48	28,76	3,89	0,98
ITEP31 (espiralado)	21	30	63,9	1,74	27,00	1,61	0,99
		90	163,5	2,40	61,63	0,97	0,96
	31	30	99,0	1,04	24,34	1,07	0,96
		90	98,7	2,18	30,35	1,80	0,97

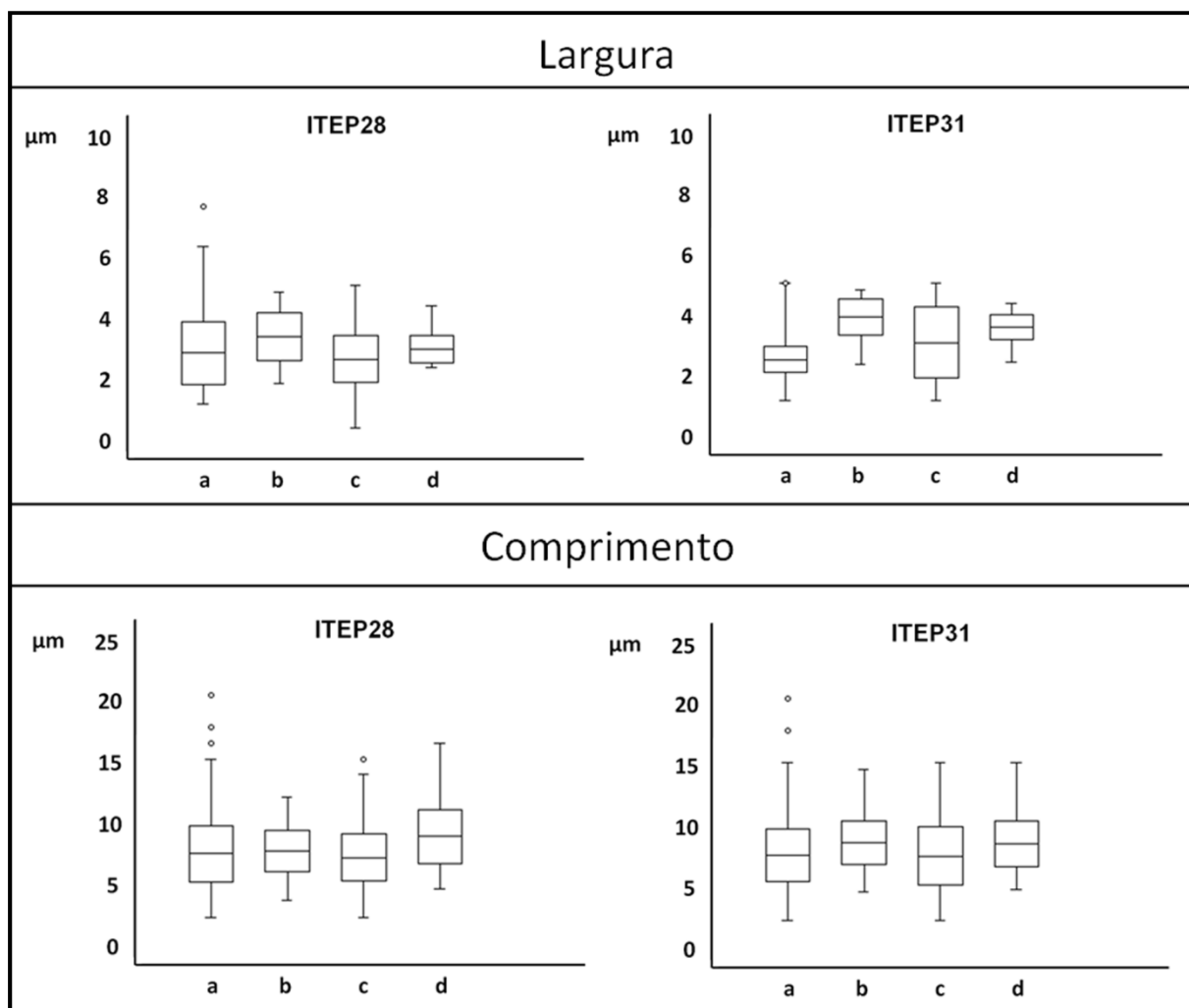


Fig. 1. Comparação das medidas de largura e comprimento em μm de células vegetativas de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **b.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **d.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C .

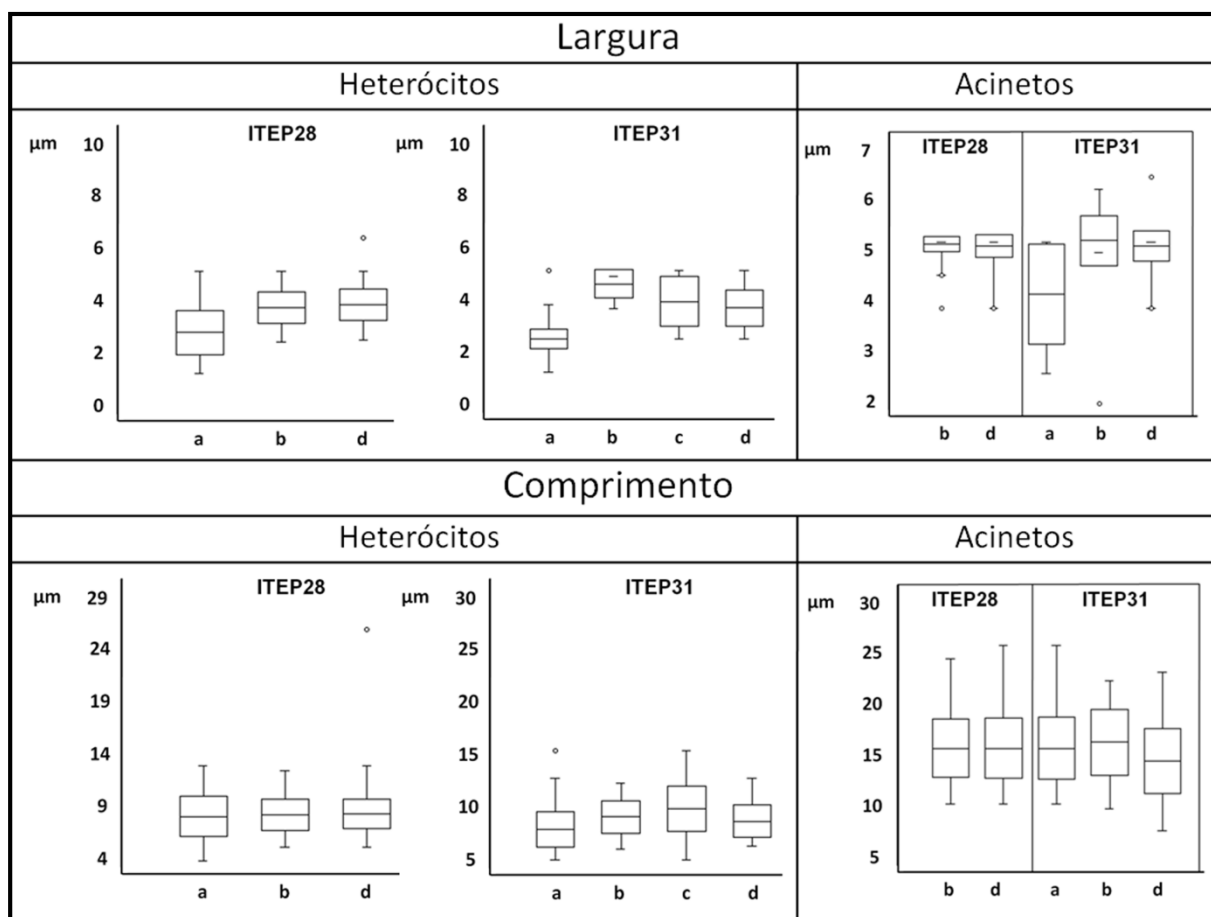


Fig. 2. Comparação das medidas de largura e comprimento em μm de heteróцитos e acinetos de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **b.** $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . **d.** $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C .

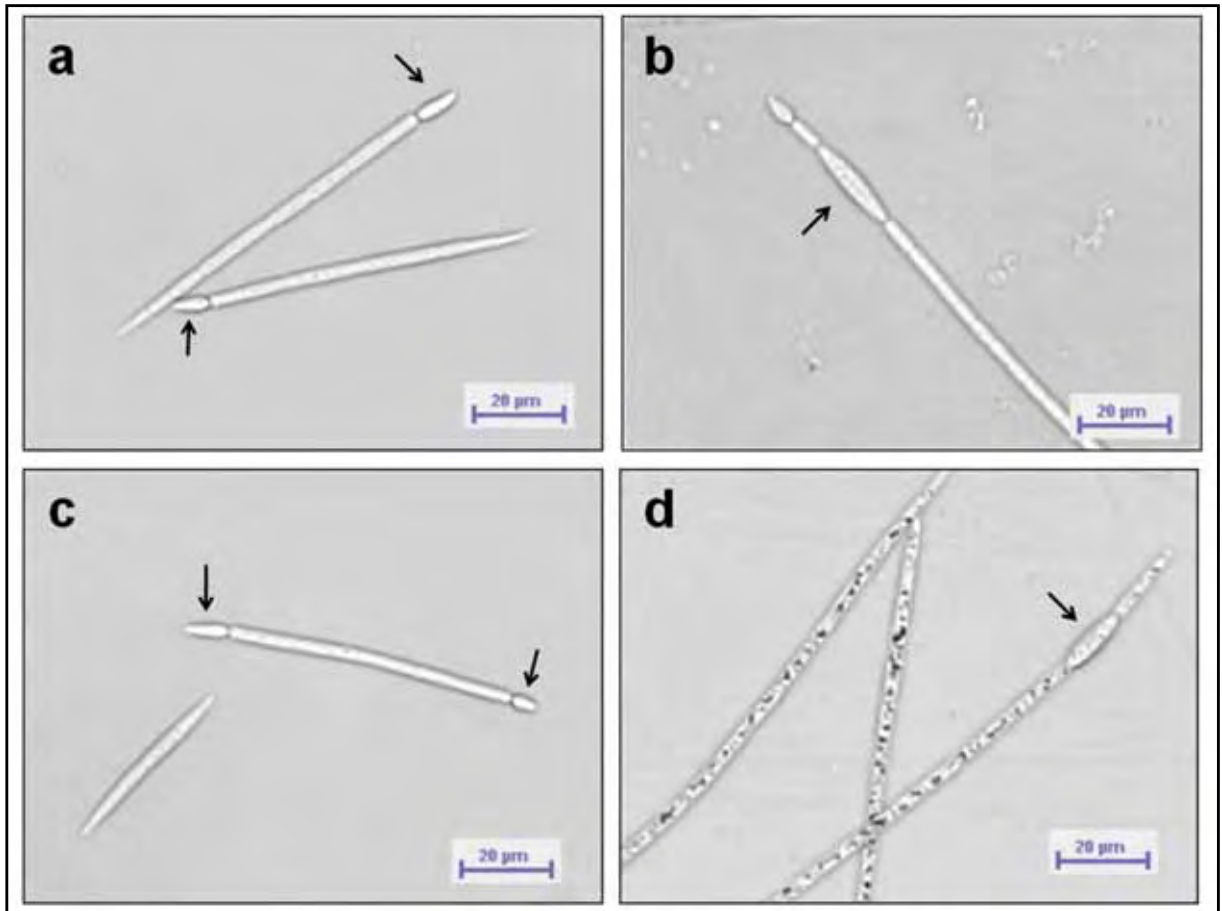


Fig. 3. Trichomas da linhagem reta (ITEP28). **a.** e **c.** As setas indicam os heterófitos.
b. e **d.** As setas indicam os acinetos.

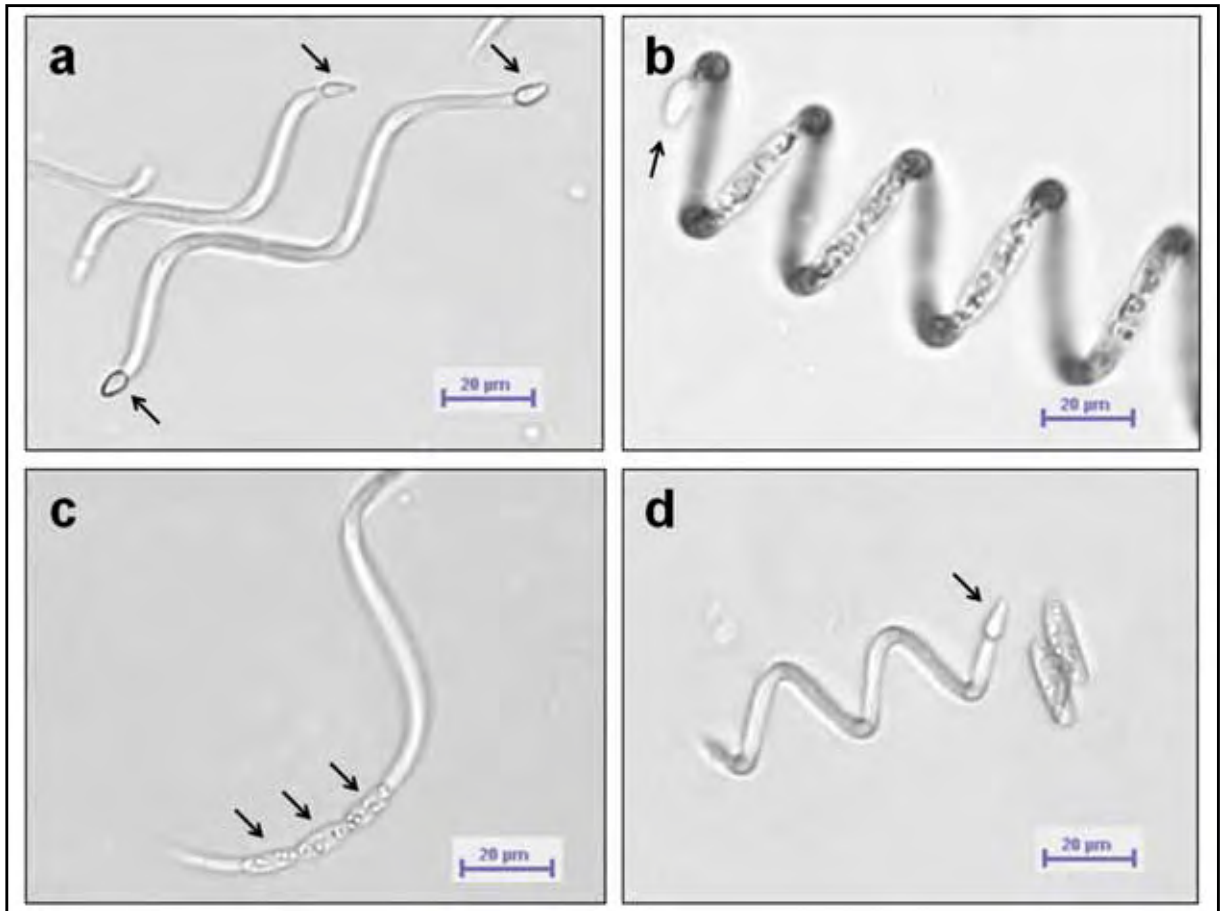


Fig. 4. Tricomas da linhagem espiralada (ITEP31). **a.**, **b.** e **d.** As setas indicam os heterócitos. **c.** As setas indicam os acinetos.

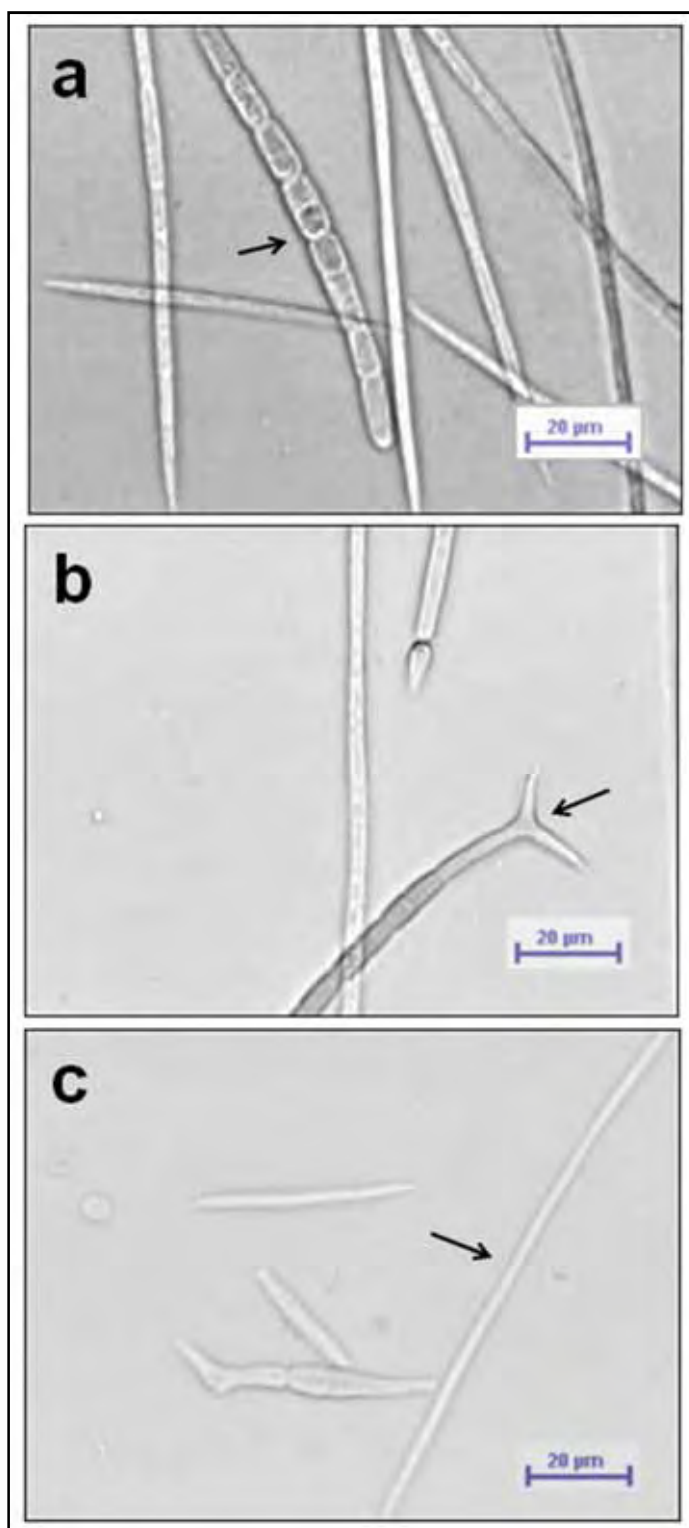


Fig. 5. Alterações morfológicas da linhagem reta (ITEP28). **a.** Tricoma constrito, indicado pela seta. **b.** Tricoma com extremidade bifurcada, indicado pela seta. **c.** Tricoma fino, indicado pela seta.



Fig. 6. Alterações morfológicas da linhagem espiralada (ITEP31). **a.** Tricoma constrito, indicado pela seta. **b.** Tricomas retos ao final da curva de $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** Tricoma com extremidade bifurcada, indicado pela seta. **d.** Tricoma fino, indicado pela seta.

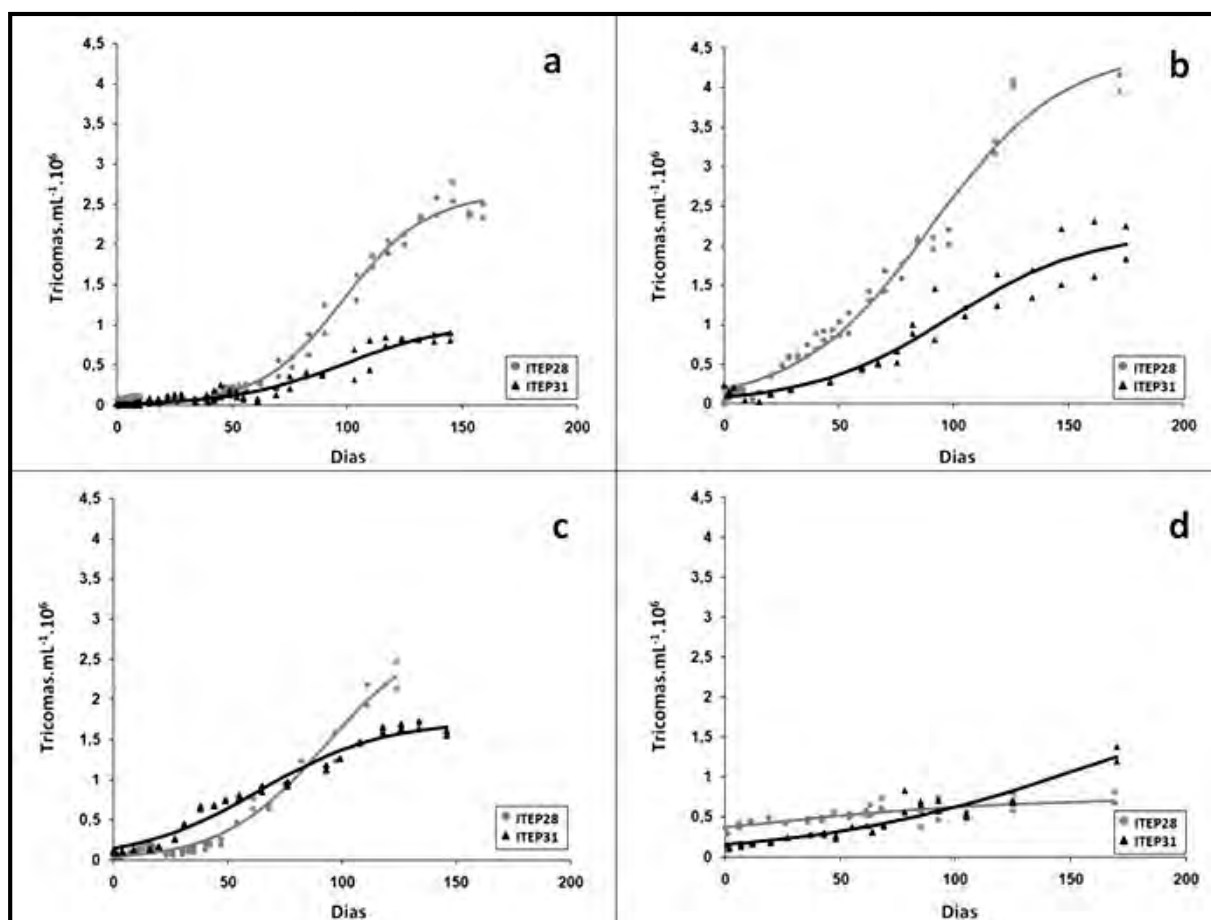


Fig. 7. Curvas de crescimento de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C. **b.** 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C. **c.** 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C. **d.** 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C.

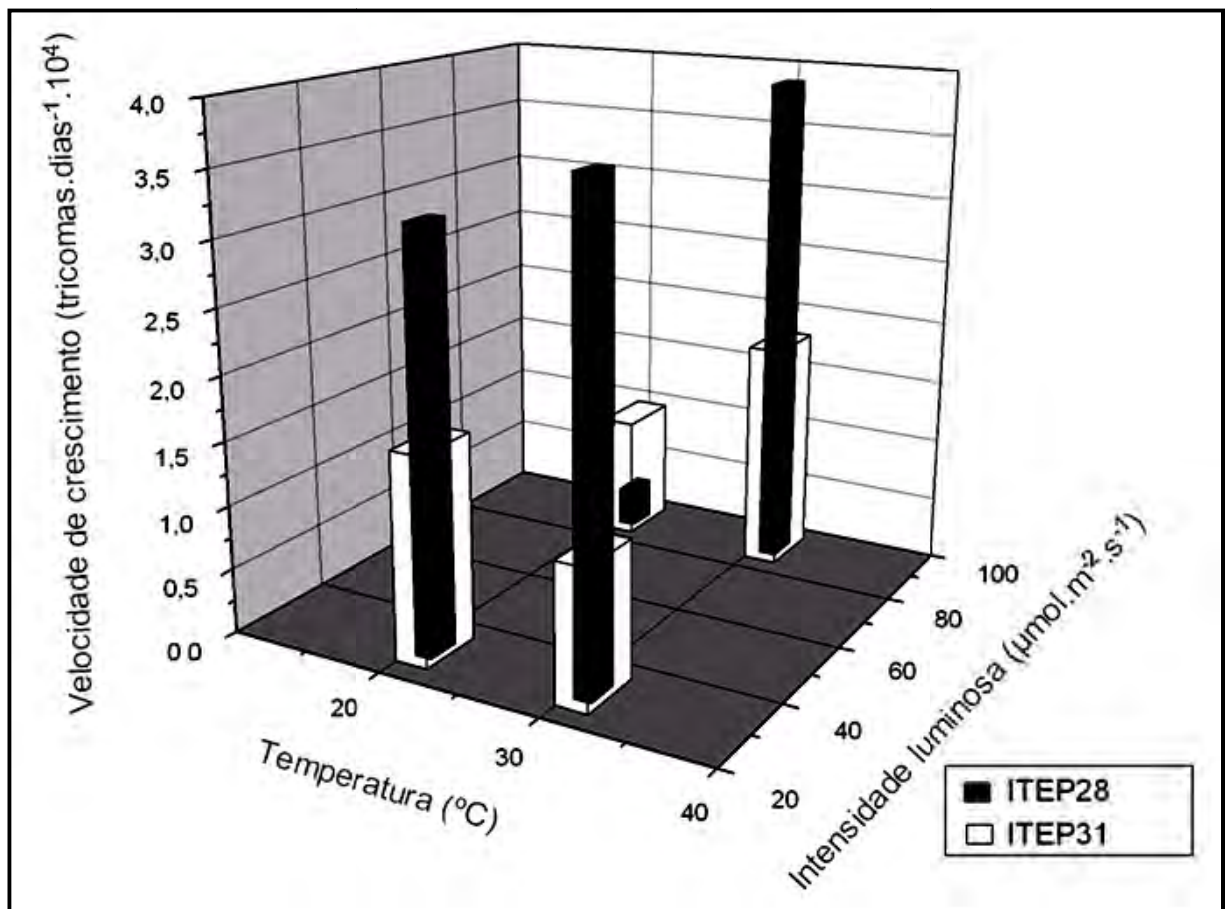


Fig. 8. Comparação das velocidades máximas de crescimento em todas as condições testadas para ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado).

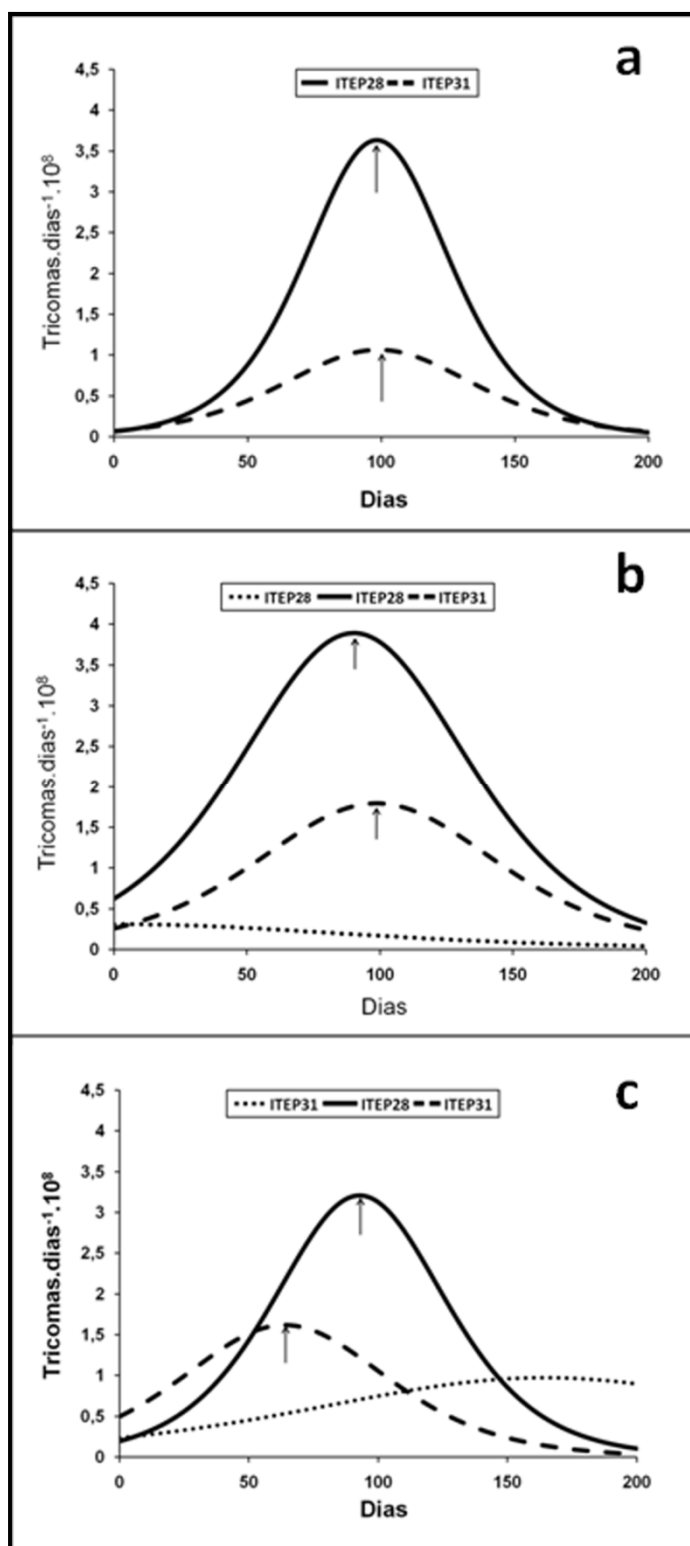


Fig. 9. Curvas de velocidade de ambas as linhagens: ITEP28 (reto) e ITEP31 (espiralado). **a.** $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **b.** $90\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 31°C . **c.** $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . As linhas pontilhadas representam a condição de $90\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 21°C . As setas indicam a velocidade máxima de crescimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2005. 334p.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRÉ, R.; KRYSS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* toxic strains: evidence of liver damage caused by a French *C. Raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and taxonomic implications. **Algological Studies**, v. 99, p. 29-37, 2000.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactéria Invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Biotechnologia: Ciência e Desenvolvimento**; v. 30, p. 82-90, 2003.

BOUIACHA, N.; NASRI, A. Short Communication: First Report of Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Algerian Freshwaters. **Environmental Toxicology**, v.19, n.5, p.541-543, 2004.

BOUVY, M.; MOLICA R.; 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**, v. 20, n. 3, p. 285-297, 1999.

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**, v. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CASTENHOLZ, R. W. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria In. BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2001. p. 473-599.

CHAPMAN, A.D. e SCHELSKE, C.L. Recent appearance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in five hypertrophic Florida lakes. **Journal of Phycology**, v.33, n. 2, p. 191-195, 1997.

CHONUDONKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; GUNJANA, T.; KAWACHI, M.; KASAI, F.; 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**, v.48, n. 3, p. 345-355, 2004.

CRONBERG, G.; KOMÁREK, J. Some Nostoclean Cyanoprocaryotes from lentic habitats of Eastern and Southern Africa. **Nova Hedwigia**, v. 78, n. 1-2, p. 71-106, 2004.

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

FABBRO, L.D. e 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.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; HUMPAGE, A.R.; MISCHKE, U.; EAGLESHAM, G.K.; CHORUS, I. *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 313-321, 2003.

FASTNER, J.; RÜCKER, J.; STÜKEN, A.; PREUBEL, K.; NIXDORF, B.; CHORUS, I.; KÖHLER, A.; WIEDNER, C. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in northeast Germany. **Environmental Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 26-32, 2007.

FERREIRA, A.C.S. **Dinâmica do fitoplâncton de um reservatório hipereutrófico (reservatório Tapacurá, Recife, PE), com ênfase em *Cylindrospermopsis raciborskii* e seus morfotipos**. Dissertação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2002.

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

GRIFFITHS, D.J.; SAKER, M.L. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, v.18, n. 2, p. 78-93, 2003.

GUGGER, M.; MOLICA, R.; BERRE, J.L.; DUFOUR, P.; BERNARD, C.; HUMBERT, J. F. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1097-1100, 2005.

GUILLARD, R.R.L. Division rates. In: STEIN, J.R. **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. p. 289–311.

HAANDE, S.; ROHRLACK, T.; BALLOT, A.; ROBERG, K.; SKULBERG, R.; BECK, M.; WIEDNER, C. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, v.7, n. 5, p. 692-701, 2008.

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 Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HAWKINS, P.R.; PUTT, E.; FALCONER, I.; HUMPAGE, A. Phenotipical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 460-467, 2001.

HOEK, C VAN DEN; MANN, D.G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 640.

KOMÁREK J. e ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. - In: BÜDEL B., KRIENITZ L., GÄRTNER G. & SCHAGERL M. **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. p. 759.

KOMÁREK, J. e HAUER, T. (2008): CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia e Inst. of Botany AS CR, <<http://www.cyanodb.cz>>. Acesso em: 20 de dez. 2008.

KOMÁRKOVÁ, J. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In **Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia**. Sociedade Ficológica da America Latina e Caribe, São Paulo, 1998. p.327-340.

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**, v.94, p. 207-222, 1999.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.O.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1359-1373, 1999.

LEE, R. E. **Phycology**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1999. p. 547.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G. K.; SHAW, G. R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITCHAI, W.; KAYA, K.; WATANABE, W. W. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, v.39, n. 7, p. 978-980, 2001.

MacCAUSLAND, M.A.; THOMPSON, P.A.; BLACKBURN, S.I. Ecophysiological influence of light and mixing on *Anabaena circinalis* (Nostocales, Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, v.40, n. 1, p. 1191-1199, 2007. OU 2005

MANTI, G.; MATTEI, D.; MESSINEO, V.; BOGIALLI, S.; SECHI, N.; CASIDDU, P.; LUGLIÉ, A.; DI BRIZIO, M.; BRUNO, M. First Report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. **Harmful Algae News**, v.28, p. 8-9, 2005.

MOHAMED, Z. A. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. **FEMS Microbiology Ecology**, v.59, n. 3, p.749-761, 2007.

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.M.F.; 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**, v. 41, n. 6, p. 606-611, 2002.

MOORE, D.; MCGREGOR, G. B.; GLEN, S.. Morphological changes during akinetes germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 40, n. 6, p. 1098-1105, 2004.

NEILAN, B.A.; SAKER, M.L.; FASTNER, J.; TOROKNÉ, A.; BURNS, B.P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**; v. 12, n. 1, p. 133-140, 2003.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 434p.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**; v. 114, n. 20, p. 7941-7942, 1992.

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

PADISÁK, J.; SOROCZKI-PINTER, E.; REZNER, Z. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton – an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 500, n. 1-3, p.243-257, 2003.

PADISAK, J. Phytoplankton. In: O'SULLIVAN, P. e REYNOLDS, C.S. **The Lakes Handbook: limnology and limnetic ecology**. Blackwell Science, 2004. Cap. 10, p. 251-303.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 856.

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

SAKER, M.L. AND GRIFFITHS, D.J., The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, v. 39, n. 4, p. 349–354, 2000.

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**, v. 35, n. 3, p. 599-606, 1999.

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**, v. 67, n. 4, p. 1839-1845, 2001.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS, V.M.; NEILAN, B.A.; EAGLESHAM, G.K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 2, p. 243-250, 2003.

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

STUCKEN, K.; MURILLO, A.A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; VÁSQUEZ, M. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n.1, p. 37-48, 2009.

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

WILSON, K.M.; SCHMBRI, M.A.; BAKER, P.D.; SAINT P.S. Molecular characterization of toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 332-338, 2000.