

SILVIA MATTOS NASCIMENTO

**UM ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE *Synechocystis aquatilis*
f. salina: A RAZÃO N/P E SUA RELAÇÃO COM O
CRESCIMENTO E A ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA**

Dissertação apresentada ao curso de
mestrado em Geociências da
Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre. Área de
concentração: Geoquímica.

Orientador: Prof. Dr. JEAN-PIERRE CARMOUZE

NITERÓI
1996

FICHA CATALOGRÁFICA

N244 Nascimento, Silvia Mattos

Um estudo ecofisiológico de *Synechocystis aquatilis* forma *salina*: A razão N/P e sua relação com o crescimento e a atividade fotossintética / Silvia Mattos Nascimento. Niterói: [s.n.], 1996.

105 f.

Dissertação (Mestrado em Geociências-Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense, 1996.

1. Ecologia de organismos. 2. Ecofisiologia. 3. Cianobactérias. 4. Nitrogênio, limitação de. 5. Lagoa da Barra, RJ. I. Título.

CDD 574.522

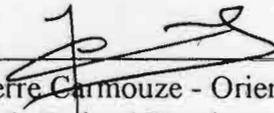
SILVIA MATTOS NASCIMENTO

UM ESTUDO ECOFISIOLÓGICO DE SYNECHOCYTIS AQUATILIS F. SALINA: A RAZÃO N/P E SUA RELAÇÃO COM O CRESCIMENTO E A ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA.

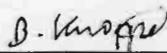
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre - Área de Concentração Geoquímica.

Aprovada em junho de 1996.

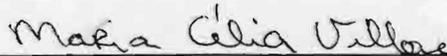
BANCA EXAMINADORA



Prof. Jean Pierre Carmouze - Orientador
Universidade Federal Fluminense e
Institut Français de Reserche Scientifique et Tecnique
pour le Developpement en Cooperation - ORSTOM



Prof. Bastiaan Adrian Knoppers
Universidade Federal Fluminense



Prof. Maria Célia Villac
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

NITERÓI
1996

Agradecimentos

- À Profª. Dra. Sandra M. F. O. Azevedo pela oportunidade de realizar este trabalho, assim como pelo apoio e orientação, além do incentivo durante todo o desenvolvimento do mesmo
- Ao Prof. Dr. Jean Pierre Carmouze pela orientação
- Ao Prof. Ricardo Chaloub pela valiosa ajuda com a metodologia e interpretação dos resultados dos experimentos sobre as atividades fotossintética e respiratória da espécie
- À Profª. Dra. Maria Célia Villac, pela sua participação na avaliação final do trabalho
- Ao Prof. Dr. Bastiaan Knoppers pelas sugestões, assim como pela sua participação na avaliação final do trabalho
- À equipe do Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas - NPPN - UFRJ, Ana, Aloysio, Pati, Patrícia, Raquel, Renato e Simone que com descontração ajudaram no bom andamento do trabalho; e especialmente ao meu amigo Renato, pela valiosa ajuda, de grande importância durante todas as etapas do trabalho
- Ao amigo Rodrigo pela ajuda nas fotos
- À Luciana e Rodolfo, sempre dispostos a ajudar
- Ao Nilson pela revelação das fotos
- Ao Prof. Dr. Alfredo e todos do Laboratório de Biologia do NPPN, Bete, Celso, Cosme, Elza, Joaquim e Marli pelo uso das instalações do laboratório e pela amizade
- À equipe da Central Analítica do NPPN, Cristina, Eduardo e Elimar pela orientação com os aparelhos
- À equipe de alunos do Laboratório de Biogeoquímica Aquática - Departamento de Geoquímica - UFF (Patrícia, Carmem, Bias, Kátia, Marcelo e Verinha), responsáveis pela coleta e análise dos dados da Lagoa da Barra, sem os quais a idéia deste trabalho não poderia ter surgido
- Aos amigos da UFF, Kátia, Jura, Renato, Marcelo, Inês, Glauca, Emanuel, Fernando...
- À todos os demais amigos
- Ao César, pelo amor e companheirismo em todas as horas

Sumário

	Pág.
Folha de aprovação	2
Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
Resumo	9
Abstract	10
1- Introdução	11
1.1- Considerações Gerais	11
1.2- Cianobactérias: Características Fisiológicas	13
1.3- A dominância das cianobactérias.....	16
1.4- A Lagoa da Barra	18
1.5- A dominância das cianobactérias na Lagoa da Barra	20
2- Objetivos.....	25
3- Material e Métodos	27
3.1- Análise de correlação - dados da Lagoa da Barra	27
3.2- Experimentos preliminares	28
3.3- Experimentos sobre o estudo ecofisiológico de <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i>	31
4- Resultados e Discussão.....	37
4.1- Análise de correlação entre as concentrações de nutrientes e a dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra	37
4.2- Experimentos para definição das condições de cultivo	39
4.3- Estudo ecofisiológico de <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i>	45
4.3.1- Crescimento	45
4.3.2- Compostos Intracelulares	51
4.3.3- Carboidratos Extracelulares	62
4.3.4- Atividades Fotossintética e Respiratória	65
4.3.5- pH	77
4.3.6- Tamanho Celular	81

	Pág.
4.3.7- Toxinas	83
4.3.8- Lagoa da Barra x Experimentos de Laboratório	85
5- Conclusões	93
6- Referências Bibliográficas	96

1- Descrição da área de estudo para localização do ponto de amostragem	14
2- Caracterização geral, salinidade das águas e condições de temperatura	14
3- Propriedades químicas das águas ASM-1/10, com respeito aos íons NH ₄ ⁺ e NO ₃ ⁻	16
4- Curvas de crescimento das águas ASM-1/10	47
5- Curvas de crescimento das águas ASM-1	50
6- Características físico-químicas, águas ASM-1/10	52
7- Características físico-químicas, águas ASM-1	56
8- Nutrientes inorgânicos, águas ASM-1/10	57
9- Nutrientes inorgânicos, águas ASM-1	62
10- Clorofila a, águas ASM-1/10	66
11- Clorofila a, águas ASM-1	68
12- Características físico-químicas, águas ASM-1/10	68
13- Características físico-químicas, águas ASM-1	68
14- Atividades Fermentativas e Respiratórias, das amostras, águas ASM-1/10	71
15- Atividades Fermentativas e Respiratórias, das amostras, águas ASM-1	71
16- Atividades Fermentativas e Respiratórias, das amostras, águas ASM-1/10	74
17- Atividades Fermentativas e Respiratórias, das amostras, águas ASM-1	75
18- Plano das águas de S. espécies de águas	83

Lista de Figuras

	Pág.
1- Mapa da área de estudo com localização do ponto de amostragem	19
2- Experimento para análise das atividades fotossintética e respiratória	34
3- Foto do experimento em meio ASM-1/10, com razões N/P 10:1 e 30:1	36
4- Curva de crescimento em meio ASM-1/10	47
5- Curva de crescimento em meio ASM-1	50
6- Carboidratos intracelulares, meio ASM-1/10	56
7- Carboidratos intracelulares, meio ASM-1	56
8- Proteínas intracelulares, meio ASM-1/10	57
9- Proteínas intracelulares, meio ASM-1	58
10- Clorofila <i>a</i> , meio ASM-1/10	60
11- Clorofila <i>a</i> , meio ASM-1	61
12- Carboidratos extracelulares, meio ASM-1/10	63
13- Carboidratos extracelulares, meio ASM-1	65
14- Atividades Fotossintética e Respiratória, fase exponencial, meio ASM-1/10	71
15- Atividades Fotossintética e Respiratória, fase exponencial, meio ASM-1	71
16- Atividades Fotossintética e Respiratória, fase estacionária, meio ASM-1/10	74
17- Atividades Fotossintética e Respiratória, fase estacionária, meio ASM-1	74
18- Foto das células de <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i>	82

Lista de Tabelas

	Pág
1- Composição do meio ASM-1	29
2- Concentrações de uréia, nitrato e fosfato nos meios ASM-1 e ASM-1/10 com diferentes razões N/P	31
3- Análise de correlação entre as concentrações de nutrientes e a dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra	37
4- Experimento amônia/nitrato	40
5- Experimento uréia/nitrato	42
6- Experimento em meio com uréia e diferentes razões N/P	43
7- Experimento para determinação do tempo de incubação das amostras para análise das atividades fotossintética e respiratória	44
8- Parâmetros para análise do crescimento de <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i>	46
9- Taxas de crescimento de outras espécies de cianobactérias	51
10- Atividades Fotossintética e Respiratória, meio ASM-1/10	67
11- Atividades Fotossintética e Respiratória, meio ASM-1	68
12- Clorofila <i>a</i> e número de células das culturas no dia do experimento de análise das atividades Fotossintética e Respiratória	77
13- pH, meio ASM-1/10	79
14- pH, meio ASM-1	80
15- Medidas das células	82

Resumo

A classe Cyanophyceae esteve sempre presente de maneira significativa na Lagoa da Barra (Maricá-Rio de Janeiro) no período de outubro de 1990 a agosto de 1993, representando em média 60% da densidade e 52% da biomassa fitoplanctônica de todo o período. A biomassa de cianobactérias apresentou uma correlação significativa negativa com as concentrações de nitrato+nitrito e as razões NID/PO₄, NOP/POP, NO₃/PT e NT/PT durante todo o período. A espécie *Synechocystis aquatilis* f. *salina* foi a espécie mais frequente dentro desta classe, representando em média, 57% da população de cianobactérias em todo o período estudado. Baseando-se nestes dados, esta espécie foi cultivada em laboratório em meio ASM-1 e ASM-1 diluído 10 vezes (ASM-1/10) com razões NO₃/PO₄ (N/P) de 3:1, 10:1 e 30:1. Foram acompanhadas a taxa de crescimento, as concentrações intracelulares de clorofila α , proteínas e carboidratos, as atividades fotossintética e respiratória, além da excreção de carboidratos. Neste estudo foi verificado que esta espécie está bem adaptada a uma condição de limitação em nitrogênio, quando comparada a demanda ideal de Redfield. Foram observadas altas concentrações de proteínas e clorofila α intracelulares em células cultivadas em meio ASM-1 com baixa N/P (3:1). As maiores taxas fotossintéticas também foram observadas nas células cultivadas em meio ASM-1, N/P 3:1. Além disso, o cultivo em meio com razão N:P 30:1 mostrou que esta espécie não está bem adaptada a esta condição. Este estudo contribui para o conhecimento das estratégias utilizadas pelas cianobactérias em situações de limitação de nitrogênio que as dotam com clara vantagem adaptativa nesta condição.

Synechocystis aquatilis f. *salina*, cianobactérias, Lagoa da Barra, razão N/P, atividade fotossintética, limitação em nitrogênio

Abstract

Over a 3-year period (October 1990 to August 1993) cyanobacteria represented 60% of the density and 52% of the biomass of the phytoplankton community of Lagoa da Barra (Maricá-RJ, Brazil). It was also seen that the cyanobacterial biomass was negatively correlated with nitrate+nitrite concentrations and DIN/PO₄, PON/POP, NO₃/TP e TN/TP ratios. *Synechocystis aquatilis* f. *salina* was the predominant species, representing 57% of the cyanobacterial density during the entire period of the study. Based on this data, the species was cultivated under laboratory conditions in ASM-1 medium and ASM-1 10 times diluted for all nutrients (ASM-1/10) with the following N/P ratios, 3:1, 10:1 and 30:1. Growth rate, chlorophyll *a*, protein and carbohydrate intracellular concentrations, carbohydrate excretion and the photosynthetic activity were investigated. It was ascertained that the species is well adapted to a condition of nitrogen limitation, compared to the Redfield ratio. High chlorophyll *a* and protein concentrations as well as the highest photosynthetic rate were observed on cultures of ASM-1 medium with low N/P ratio (3:1). Furthermore, the cultures in medium with the highest N/P ratio (30:1) showed that the species is not adapted to this condition. This study is a contribution to the knowledge of the strategies utilized by cyanobacteria, which gives them a competitive advantage under nitrogen limitation.

Synechocystis aquatilis f. *salina*, cyanobacteria, Lagoa da Barra, N/P ratio, photosynthetic activity, nitrogen limitation

1 - Introdução

1.1 - Considerações Gerais

Os nutrientes, assim como o sistema do ácido carbônico ($\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O}$), luz, temperatura e as interações com outros níveis tróficos são algumas das variáveis que controlam a estrutura e a biomassa da comunidade fitoplanctônica. O resultado da competição pelos recursos nessa comunidade é determinado pelas características fisiológicas das microalgas, pelas taxas de suprimento e razões dos nutrientes potencialmente limitantes, além das taxas de mortalidade (frequentemente um resultado da pastagem pelo zooplâncton ou sedimentação) vivenciadas por uma espécie particular (Tilman *et al.*, 1982). Desta maneira, organismos que se mostrarem melhor adaptados às variações destes recursos no ambiente tendem a dominar a comunidade fitoplanctônica.

Obter sucesso em um dado ecossistema quase sempre significa que a espécie deve ser flexível o bastante nos seus requerimentos, resistindo desde a situações fora da faixa considerada ótima com respeito a um parâmetro, até situações mais favoráveis com respeito a outros parâmetros. Deste modo, sob a maioria das condições naturais, o desempenho da

espécie fitoplanctônica em condições sub-ótimas será de maior significado ecológico do que aquele sobre condições ótimas (Darley, 1982).

É bem estabelecido que as propriedades fisiológicas de uma espécie são influenciadas pelo ambiente. Fenótipos apropriados aos diferentes tipos de fatores que limitam o crescimento são selecionados de maneira que possam competir com sucesso nas condições dadas (Zevenboom, 1987).

Lagos eutróficos são frequentemente dominados por cianobactérias durante intervalos de tempo consideráveis. Segundo Reynolds *et al.* (1987) e Tilzer (1987), estes organismos são favorecidos em relação a outras espécies fitoplanctônicas, devido às suas características biológicas únicas, que as dotam com grande vantagem adaptativa nestes ambientes.

Algumas cianobactérias são capazes de desenvolver "blooms", que se caracterizam pelo acúmulo maciço (10^4 a 10^6 células por mililitros) de uma ou, menos frequentemente, duas espécies que podem chegar a representar de 95 a 99% da biomassa fitoplanctônica (Paerl, 1988).

De maneira geral, tem sido aceito que as condições ambientais que favorecem a formação de "blooms" de cianobactérias incluem temperaturas entre 15 e 30°C, níveis de pH neutro a alcalino, condições de vento calmo e altas concentrações de nutrientes, especialmente fosfato e nitrogênio (Skulberg *et al.*, 1984, Wicks & Thiel, 1990, Carmichael, 1994). O aumento da poluição dos corpos d'água tem aumentado os níveis destes nutrientes nas águas através do processo de eutrofização, criando as condições necessárias ao desenvolvimento destes "blooms". Consequentemente, tem sido reportado um número cada vez maior de "blooms" de cianobactérias em todo o mundo, inclusive no Brasil (Carmichael, 1994, Azevedo *et al.*, 1994).

Muitas espécies de cianobactérias que formam “blooms” produzem substâncias hepatotóxicas e/ou neurotóxicas, que são responsáveis pelo envenenamento de animais em várias partes do mundo. Além disso, estes “blooms” tem uma aparência desagradável, exalam forte odor e comprometem os usos potenciais do corpo d’água (Skulberg *et al.*, 1984, Paerl, 1988, Carmichael, 1992 e 1994, Azevedo *et al.*, 1994).

1.2 - Cianobactérias: Características Fisiológicas

Cianobactérias (cianofíceas ou algas azul-esverdeadas) são microrganismos procariotos, capazes de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio (Whitton & Carr, 1982). Ocorrem em ambientes de água doce, salobra e marinha, em ambientes terrestres e como simbioses.

Possuem como pigmentos a clorofila *a* e as ficobilinas, que são complexos de pigmentos protéicos, baseados na ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, que determinam a cor característica do organismo (Whitton & Carr, 1982). Além disso compõem o sistema antena, que auxilia na captação de luz para a fotossíntese e protege a clorofila da fotooxidação (Kromkamp, 1987). Este complexo de pigmentos confere às cianobactérias uma alta eficiência fotossintética e a capacidade de sustentar uma produção fotossintética líquida em baixas intensidades luminosas (Reynolds *et al.*, 1987).

O aparato fotossintético das cianobactérias, isto é, os componentes celulares necessários à formação de ATP e NADPH, a energia e o poder redutor para a fixação do CO₂, é bastante similar em estrutura, função e aspectos moleculares ao de algas eucariotas e plantas superiores. No entanto, nas cianobactérias as membranas fotossintéticas (tilacóides)

se encontram dispersas no citoplasma, já que se trata de um organismo procarioto. Tanto a fotossíntese quanto a respiração ocorrem nos tilacóides (Whitton & Carr, 1982).

Algumas espécies são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, através de células especializadas, os heterocistos ou através de outros mecanismos distintos. Estas espécies são favorecidas quando as concentrações de nitrato e amônia se tornam muito baixas no ambiente.

A capacidade de armazenar nutrientes quando sua concentração está em excesso à demanda imediata, confere grande vantagem, visto que estas reservas podem ser usadas para sustentar o crescimento em condições de limitação de nutrientes. O fósforo é armazenado na forma de polifosfatos e o nitrogênio principalmente nas cianoficinas, que são polímeros de aspartato e arginina exclusivos das cianobactérias, e também nas ficobilinas (Kromkamp, 1987). A elaboração de um composto nitrogenado com a função específica de reserva, parece ser uma característica exclusiva das cianobactérias (Ormerod, 1992).

Algumas espécies de cianobactérias são capazes de produzir substâncias que quando excretadas podem agir como inibidoras do crescimento de outras espécies, como fazem por exemplo algumas espécies do gênero *Oscillatoria*.

A capacidade de controlar seu flutuamento através da formação de vacúolos gasosos é uma característica importante de algumas espécies de cianobactérias. Isto permite uma melhor exploração da coluna d'água através da migração para lugares com condições ótimas de luz e nutrientes, o que constitui uma vantagem competitiva sobre outras algas planctônicas (Reynolds *et al.*, 1987, Humphries & Lyne, 1988).

Zevenboom & Mur (1980) mostraram que as cianobactérias apresentam requerimentos de luz mais baixos do que os eucariotos. Esta diferença cria uma vantagem seletiva para muitas cianobactérias sobre eucariotos, em condições de baixa intensidade

luminosa, permitindo-as obter maiores taxas de crescimento. Além disso, a alta resistência à radiação excessiva, rica em radiações perto do espectro do UV também já foi descrita por Paerl (1988) para cianobactérias. Desta maneira, estes organismos são capazes de sobreviver às condições extremas de luz, características da superfície da água e também de sustentar sua biomassa em condições de limitação de luz, de maneira mais eficiente do que algas eucariotas (Tilzer, 1987).

As cianobactérias também diferem das algas eucariotas pela capacidade de ajustar seus estoques de carbono e energia à diferenças na duração do fotoperíodo, e não apenas à variações na intensidade luminosa, que é uma característica comum a todas as algas (Kromkamp, 1987). Cianobactérias se adaptam a mudanças no fotoperíodo variando a concentração de pigmentos, o que altera sua eficiência fotossintética. Desta maneira, estes organismos otimizam a síntese de polissacarídeos, podendo aumentar sua taxa de crescimento no escuro, através do uso de suas reservas (Kromkamp, 1987).

A produção de sideróforos, que são compostos extracelulares com a capacidade de ligarem-se ao ferro, solubilizando-o e tornando-o disponível para o uso específico das cianobactérias, confere uma vantagem sobre outras algas que pode levar à exclusão competitiva (Rueter & Petersen, 1987). Não só o ferro, mas também o cobre é ligado aos sideróforos, diminuindo a atividade deste metal e assim sua toxicidade, o que também favorece às cianobactérias, visto que estes organismos são mais sensíveis ao cobre do que algas eucariotas (Rueter & Petersen, 1987).

Além disso, apresentam uma grande flexibilidade metabólica, que as permite tolerar extremos de temperatura, alcalinidade, assim como sobreviver em ambientes microaerofílicos. Entretanto, é importante salientar que nem todas as espécies de cianobactérias são adaptadas à ampla faixa de variabilidade ambiental, mas sim que espécies particulares são

adaptadas à explorar seletivamente diferentes partes do espectro de circunstâncias ambientais que podem ocorrer em lagos (Reynolds *et al.*, 1987).

1.3 - A dominância das cianobactérias

No final da década de 70, começaram os primeiros estudos que tentavam relacionar as características da coluna d'água com a presença de cianobactérias. Schindler (1977) e Flett *et al.* (1980) mostraram que em situações de baixas razões Nitrogênio Total/Fósforo Total (NT/PT) (razões < 10), as cianobactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico eram favorecidas.

Smith (1983), baseado em um trabalho de revisão usando dados de 17 lagos, estendeu a hipótese de Schindler (1977), propondo que baixas razões NT/PT promovem a dominância não só das cianobactérias fixadoras de nitrogênio, mas de todo o grupo, identificando o valor da NT/PT igual a 29 como um limite entre a região onde as cianobactérias tendem a dominar e onde elas se tornam raras.

Posteriormente, Smith (1985) propõe um modelo baseado na razão NT/PT e intensidade luminosa para explicar a dominância das cianobactérias. De acordo com o modelo, as cianobactérias seriam favorecidas em condições de baixa razão NT/PT e intensidades luminosas limitantes. Tilman *et al.* (1986) observaram a superioridade competitiva das cianobactérias em relação às diatomáceas, em condições de baixa razão N/P e temperaturas de 24°C.

Outro modelo foi proposto por McQueen & Lean (1987), baseado na razão NO_3/PT e na temperatura, que relaciona a presença de cianobactérias à razões $\text{NO}_3/\text{PT} < 5$ e temperaturas maiores que 21°C. Trimbee & Prepas (1987) sugerem que o grau de

eutrofização, estimado pelos níveis de fósforo total, é o fator predominante na determinação da dominância das cianobactérias na comunidade fitoplanctônica. Pick & Lean (1987) ressaltam a importância de fatores físicos como a temperatura e a estabilidade da coluna d'água. Entretanto, estes autores concordam que as cianobactérias frequentemente se tornam o grupo dominante em lagos eutrofizados.

Shapiro (1990) conclui que apesar de fatores como a razão N/P, baixas intensidades luminosas, altas temperaturas, capacidade de flutuação e a baixa taxa de pastagem pelo zooplâncton contribuírem para a dominância das cianobactérias, a hipótese do CO₂-pH sozinha pode explicar esta dominância. De acordo com esta hipótese, as cianobactérias são melhores competidoras em faixas de pH altos, quando a concentração de CO₂ é muito baixa, devido aos seus menores valores de ¹K_s ("half-saturation constant") para o carbono e ao mecanismo de concentração do CO₂.

Hyenstrand (1994), Hyenstrand *et al.* (1995) e Blomqvist *et al.* (1994) em uma revisão recente sobre as hipóteses formuladas para explicar a dominância das cianobactérias propõem nova hipótese, baseada na forma de nitrogênio inorgânico disponível. De acordo com esta hipótese, o sucesso das cianobactérias não fixadoras de nitrogênio está relacionado à presença de amônia no ambiente, enquanto que o nitrato favorece a dominância de organismos eucariotos. No entanto, ressaltam que nenhuma das hipóteses individualmente é capaz de explicar o sucesso ecológico das cianobactérias, já que tal fato é uma função de forças que atuam de maneira sinérgica. Além disso, os autores sugerem que as cianobactérias sejam tratadas individualmente, visto que constituem um grupo de organismos muito heterogêneo, com adaptações distintas à diferentes condições ambientais.

¹ K_s é a concentração do substrato onde a velocidade de assimilação corresponde a metade da velocidade máxima. Esta constante reflete a afinidade do sistema enzimático pelo substrato, um baixo valor de K_s sugere uma alta afinidade.

1.4 - A Lagoa da Barra

A Lagoa da Barra faz parte do Sistema Lagunar de Maricá, localizado na região costeira do estado do Rio de Janeiro entre as latitudes 22° 52' e 22° 58'S e as longitudes 42° 40' e 43° 00'. Este sistema é formado por uma série de lagunas e canais interligados: a Lagoa de Maricá (19 Km²), a Lagoa do Padre (2.2 Km²), a Lagoa de Guarapina (6.5 Km²), além da Lagoa da Barra (6.5 Km²) (Figura 1). Suas profundidades variam entre 0.5 e 2.0 metros. Os aportes continentais provêm de três rios principais, dos quais dois deles desembocam na lagoa de Maricá e o outro na lagoa de Guarapina (Barroso *et al.*, no prelo).

A Lagoa de Maricá recebe os efluentes domésticos da cidade de Maricá (50.000 habitantes), que não sofrem qualquer tipo de tratamento. Os estudos realizados na Lagoa da Barra (Carmouze *et al.*, no prelo a, Carmouze *et al.*, no prelo b, Domingos *et al.*, no prelo e Arcifa *et al.*, no prelo) mostram que esta lagoa sofre um processo avançado de eutrofização, que se traduz pela simplificação da sua organização trófica, o que é corroborado pela grande importância da reciclagem da matéria orgânica através do "microbial loop" (Barroso *et al.*, no prelo).

O clima da região do sistema lagunar é tipicamente tropical úmido, praticamente sem déficit de água, com calor distribuído o ano todo. A temperatura média anual fica em torno de 23°C e a pluviosidade entre 1100 e 1300 mm (FUNDREM², 1989 citado em Barroso *et al.*, no prelo).

²FUNDREM, 1989. Plano Diretor Urbano de Maricá, RJ. Fundação para o Desenvolvimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 176 p.

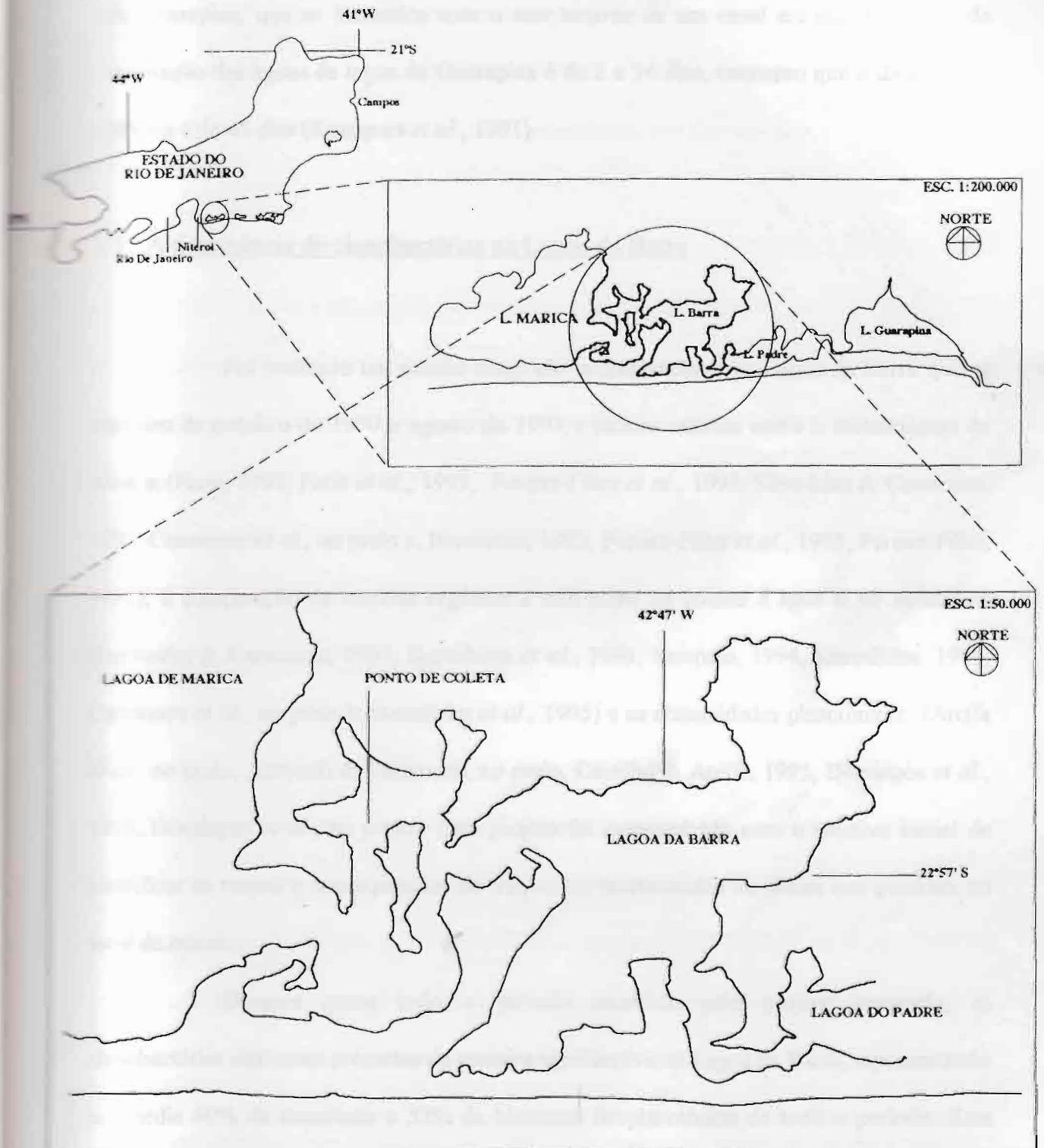


Figura 1: Mapa de localização da Lagoa da Barra.

A influência da maré é muito atenuada, sendo perceptível apenas na lagoa de Guarapina, que se comunica com o mar através de um canal estreito. O tempo de renovação das águas da lagoa de Guarapina é de 2 a 14 dias, enquanto que o da lagoa de Mária é de 45 dias (Knoppers *et al.*, 1991).

1.5 - A dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra

Foi realizado um estudo integrado multidisciplinar na Lagoa da Barra que se estendeu de outubro de 1990 a agosto de 1993 e incluiu estudos sobre o metabolismo do sistema (Faria, 1993, Faria *et al.*, 1993, Pereira-Filho *et al.*, 1993, Silva-Lins & Carmouze, 1993, Carmouze *et al.*, no prelo a, Bernardes, 1995, Pereira-Filho *et al.*, 1995, Pereira-Filho, 1995), a composição da matéria orgânica e nutrientes na coluna d'água e no sedimento (Bernardes & Carmouze, 1993, Kuroshima *et al.*, 1993, Sampaio, 1994, Kuroshima, 1995, Carmouze *et al.*, no prelo b, Bernardes *et al.*, 1995) e as comunidades planctônicas (Arcifa *et al.*, no prelo, Azevedo & Carmouze, no prelo, Castilho & Arcifa, 1995, Domingos *et al.*, 1995, Domingos *et al.*, no prelo). Este projeto foi desenvolvido com o objetivo inicial de identificar as causas e consequências de frequentes mortandades de peixes que ocorrem no local de estudo.

Durante quase todo o período estudado pelo projeto integrado, as cianobactérias estiveram presentes de maneira significativa na Lagoa da Barra, representando em média 60% da densidade e 52% da biomassa fitoplanctônica de todo o período. Este grupo chegou a representar 90% da biomassa fitoplanctônica total no mês de janeiro de 1991 e 74% da biomassa total no período de outubro de 1991 a julho de 1992. A espécie *Synechocystis aquatilis* f. *salina* foi a espécie mais frequente, representando em média, 57%

da população de cianobactérias em todo o período estudado. Esta espécie chegou a representar 99,9% da população de cianobactérias no mês de janeiro de 1991 e 54% desta população no período de outubro de 1991 a julho de 1992. No mês de julho de 1992 esta espécie constituía 87% da população de cianobactérias, que representava 89% da biomassa fitoplanctônica total.

A dominância de organismos de pequeno tamanho ($<20\mu\text{m}$), principalmente as cianobactérias, na comunidade fitoplanctônica da lagoa entre outubro de 1990 e junho de 1991 foi ressaltada por Domingos *et al.* (no prelo). Estes autores discutem sobre os fatores ambientais que teriam levado à dominância desses organismos durante este período do estudo. As altas temperaturas, elevados valores de pH ou baixas concentrações de CO_2 , pequenas taxas de predação pelo zooplâncton e as baixas concentrações de nitrogênio do meio são alguns fatores sugeridos como contribuidores para a dominância das cianobactérias na Lagoa da Barra. No entanto, a disponibilidade de nitrogênio no meio parece ter tido um papel preponderante sobre a estrutura e o funcionamento da comunidade fitoplanctônica, sendo que as cianobactérias se mostraram dominantes quando as concentrações de nitrogênio do meio foram menores que $2\text{-}3\ \mu\text{mol/l}$ (Domingos *et al.*, no prelo).

No mês de janeiro de 1991, a concentração média de nitrogênio inorgânico da coluna d'água era de $1,9\ \mu\text{mol/l}$, tendo sido observadas razões NID/PID de 2:1 e NT/PT de 8:1 em média, caracterizando uma forte carência em nitrogênio. Neste mês, *S. aquatilis* f. *salina* representava 90% da biomassa e densidade fitoplanctônica total.

Nos dias 9, 10 e 11 de fevereiro de 1991, houve uma mortandade maciça de peixes filtradores da espécie *Brevoortia tyrannus aurea* (savelha), que coincidiu com a senescência da população de *S. aquatilis* f. *salina*. Estes peixes apresentaram sinais evidentes de morte causada por hemorragia das vias respiratórias e digestivas, o que levou a hipótese

de que estes organismos teriam sido intoxicados. Azevedo & Carmouze (no prelo) verificaram a toxicidade de amostras da população natural coletadas logo após a mortandade, em bioensaios com camundongos Swiss, tendo sido obtida uma dose letal mínima (DL_{min}) de 31 mg/Kg de peso corpóreo do animal. Entretanto, foi observada uma diminuição acentuada da toxicidade das células isoladas de *S. aquatilis* f. *salina* quando cultivadas em laboratório. Segundo esses autores, as células de *S. aquatilis* f. *salina* tendo entrado em senescência, poderiam ter iniciado ou aumentado a produção de um composto hemolítico que foi fatal aos peixes *Brevoortia tyrannus aurea* (savelha), como já foi observado para uma espécie do gênero *Synechococcus* por Mitsui *et al.* (1989) e para *Anabaena flos-aquae* por Rodger *et al.* (1994).

Arcifa *et al.* (no prelo) encontraram uma correlação negativa significativa entre as densidades de *Apocyclops procerus* (copépodo) e *Brachiomus plicatilis* (rotífero) em relação a densidade de cianobactérias na Lagoa da Barra, no período de outubro de 1990 a junho de 1991. Segundo esses autores, as cianobactérias constituem um alimento inadequado para o zooplâncton, devido ao seu baixo valor nutricional e seu tamanho pequeno. Desse modo, a pastagem sobre esses organismos é considerada pouco eficiente.

Pereira-Filho (1995) através de uma análise estatística dos dados de todo o período (análise de agrupamento), correlacionou a dominância de cianobactérias e organismos de pequeno tamanho na Lagoa da Barra com períodos caracterizados pelo metabolismo elevado, elevada concentração de matéria orgânica particulada e baixas concentrações de nitrato.

Neste trabalho foi realizada uma análise de correlação com o intuito de identificar os parâmetros nutricionais relacionados à dominância das cianobactérias na lagoa. A partir dessa análise foi realizado um estudo experimental, com culturas de laboratório da

espécie *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, identificada como a espécie predominante no grupo das cianobactérias durante quase todo o período estudado. Este estudo visou analisar a fisiologia desta espécie em resposta a cultivos em diferentes razões N/P, além de verificar algumas hipóteses levantadas a partir dos dados de campo. Resultados preliminares deste estudo podem ser encontrados em Nascimento & Azevedo (1995).

Este tipo de estudo, com culturas de uma única espécie fitoplanctônica é útil principalmente porque permite uma avaliação sob condições definidas e reproduzíveis e seus resultados são frequentemente menos ambíguos do que os obtidos com amostras naturais.

A vantagem do sistema experimental, com culturas de laboratório é que o investigador pode manipular um fator a cada vez. Durante um estudo em um sistema natural, muitos parâmetros estão frequentemente mudando simultaneamente, tornando difícil a identificação dos efeitos de um dos fatores ambientais em particular (Darley, 1982).

Vale ressaltar que existem diferenças ecológicas significativas entre culturas e sistemas naturais e assim, comparações e extrapolações de um para o outro devem ser feitas com cautela. No entanto, esta abordagem cuidadosa não deve nos impedir de tomar vantagem dos benefícios oferecidos por cada um (Darley, 1982). Além disso, é evidente que o conhecimento em ecologia só é plenamente alcançado com o somatório de estudos de campo e estudos fisiológicos e bioquímicos em condições precisamente controladas.

Através da pesquisa ecofisiológica, é obtido conhecimento sobre as várias estratégias de adaptação de espécies fitoplanctônicas em resposta a mudanças do ambiente. Estudos com culturas de laboratório são importantes já que revelam os fatores que estimulam a resposta adaptativa e tornam as extrapolações para o campo mais realistas (Zevenboom, 1987). Mc Cormick & Cairn (1994) ressaltam a importância de estudos

experimentais sobre os limites de tolerância de espécies fitoplanctônicas, como uma maneira de determinar o impacto sofrido pelo ecossistema.

Em estudos sobre o fluxo de carbono, produção primária, crescimento potencial do fitoplâncton e para o manejo das águas, a identificação dos fatores que limitam a taxa de crescimento de populações fitoplanctônicas em seu ambiente natural se tornou importante.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo Geral

Condições para a implementação metodológica de espécies X espécies Y águas, que se refere diretamente ao conhecimento fundamental da Lagoa de Barra e à implementação caracterizada por métodos de uma disciplina.

• Avaliar os efeitos ambientais no sistema dos corpos d'água, principalmente de espécies X espécies Y águas, na comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Barra através de estudos realizados pelo projeto integrado.

1.7.2. Objetivos Específicos

• Avaliar que efeitos de alterações com o tempo de ocorrência em parâmetros de qualidade ambiental relacionados a distribuição por distribuição na Lagoa de Barra

• Avaliar o crescimento de espécies em áreas com diferentes níveis de produtividade de matéria orgânica

2- Objetivos

2.1- Objetivos Gerais

- Contribuir para o conhecimento ecofisiológico da espécie *S. aquatilis* f. *salina*, que se mostrou dominante na comunidade fitoplanctônica da Lagoa da Barra e é frequentemente encontrada em ambientes da costa fluminense.

- Auxiliar no melhor entendimento do sucesso das cianobactérias, especialmente da espécie *S. aquatilis* f. *salina*, na comunidade fitoplanctônica da Lagoa da Barra durante o período estudado pelo projeto integrado.

2.2- Objetivos Específicos

- Realizar uma análise de correlação com o intuito de identificar os parâmetros nutricionais melhor relacionados a dominância das cianobactérias na Lagoa da Barra.

- Estudar o crescimento da espécie em meios com diferentes razões N/P e concentrações de demais nutrientes.

- Identificar as mudanças nas concentrações intracelulares de clorofila α , proteínas e carboidratos decorrentes das condições de cultivo.
- Acompanhar as taxas de excreção de carboidratos durante o crescimento da espécie nas diferentes condições de cultivo.
- Analisar o efeito das condições de cultivo nas atividades fotossintética e respiratória e na produção de toxinas por esta espécie de cianobactéria.
- Verificar uma possível mudança do tamanho celular decorrente das diferentes condições de cultivo.
- Correlacionar as mudanças fisiológicas encontradas no laboratório com os dados do estudo de campo.

3- Material e Métodos

3.1 - Análise de correlação - dados da Lagoa da Barra

Baseado nos trabalhos de Smith (1983 e 1985), Mc Queen & Lean (1987) e Blomqvist *et al.* (1994), foi realizada uma análise de correlação de Pearson utilizando-se o programa estatístico "Statistica". Esta análise foi feita entre as seguintes variáveis na Lagoa da Barra: concentrações de amônia (n=114), nitrato+nitrito (n=114) e fosfato (n=114), as razões NID/PO₄ (n=113), NOP/POP (n=114), NO₃/PT (n=114) e NT/PT (n=114), salinidade (n=114) e pH (n=113) em relação à porcentagem de cianobactérias e da espécie *S. aquatilis* f. *salina* sobre a densidade total da comunidade fitoplanctônica e em relação à porcentagem do carbono fitoplanctônico na fração das cianobactérias (biomassa de cianobactérias), em todo o período estudado.

3.2 - Experimentos preliminares

A espécie *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (NPLB-2) (Classe Cyanophyceae) foi isolada de amostras da água da Lagoa da Barra, Complexo lagunar de Maricá, R.J., em fevereiro de 1991 pelo Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas do NPPN, UFRJ.

Desde então, esta espécie está sendo mantida no banco de cultivo do laboratório em culturas uniaxiais não axênicas, em meio ASM-1 (Gohram, 1964) com pH inicial 8, a uma temperatura de 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e iluminação de $40 \mu\text{mol}$ de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; proveniente de tubos de lâmpadas frias.

Para que se pudesse escolher a fonte de nitrogênio e as razões Nitrogênio:Fósforo (N/P) a serem utilizadas no estudo ecofisiológico da espécie foram realizados alguns experimentos preliminares. Os inóculos utilizados nesses experimentos foram cultivados sob as mesmas condições descritas para o banco de cultivo.

Inicialmente, *S. aquatilis* f. *salina* foi cultivada em meio ASM-1 (Tabela 1) onde a forma de nitrogênio oferecida às células foi modificada de nitrato para amônia, respeitando-se a concentração normal do meio, já que a amônia era a principal forma de nitrogênio encontrada na lagoa. Uma cultura tendo o nitrato como forma de nitrogênio foi usada como controle, visto que este nutriente é utilizado como fonte de nitrogênio no meio ASM-1. Este experimento foi realizado em erlemmeyers de 500ml com 250ml de meio, em duplicata e teve duração de 10 dias.

O crescimento foi monitorado por contagens de células em microscópio ótico, amostradas em dias alternados, utilizando-se um hemocitômetro de Fucks-Rosenthal. Foram calculados a taxa de crescimento (μ) e o tempo médio de duplicação (G), segundo as seguintes equações extraídas de Fogg & Thake (1987):

$$\mu = (\log_N N - \log_N N_0) / t \text{ onde,}$$

N = número de células por mililitros após um período de tempo t

N_0 = número de células por mililitros no tempo zero

$$G = \log_{10} 2 / \mu$$

O rendimento máximo de cada cultura, que representa o número máximo de células atingido em cada condição de cultivo, também foi analisado.

Tabela 1: Composição do meio ASM-1, concentrações em $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Sal	ASM-1
NaNO_3	2000
MgSO_4	200
MgCl_2	200
CaCl_2	200
KH_2PO_4	128
Na_2HPO_4	100
FeCl_3	4
H_3BO_3	40
MnCl_2	7
ZnCl_2	2.2
CoCl_2	0.08
CuCl_2	0.014
Na_2EDTA	20

Posteriormente, *S. aquatilis* f. *salina* foi cultivada em meio contendo uréia como fonte de nitrogênio, o controle com nitrato foi mais uma vez utilizado. Este experimento teve duração de 21 dias e os procedimentos foram os mesmos já descritos para o cultivo com amônia.

Concomitantemente, foi realizado um terceiro experimento utilizando-se meio ASM-1 e meio ASM-1 diluído 10 vezes (ASM-1/10), tendo a uréia como forma de nitrogênio e diferentes razões N/P, 2:1, 3:1, 4:1 e 10:1. O controle com ASM-1 normal, isto é, com nitrato e N/P igual a 10:1 também foi monitorado. Foram utilizados tubos com

aproximadamente 30ml de volume de meio, em triplicata para cada condição de cultivo, perfazendo um total de 27 tubos.

Esse experimento teve duração de 14 dias, tendo sido realizadas 3 amostragens, no dia zero, no 7° e 14° dias após a inoculação, quando foram determinados o número de células por mililitro e a concentração celular de clorofila α , nos dias 7° e 14° do cultivo, através de análise espectrofotométrica, após extração com metanol 100% durante 15 minutos, sendo a análise feita no mesmo dia da amostragem. A taxa de crescimento foi calculada a partir do número de células, assumindo-se que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre os dias zero e sétimo do cultivo. O cálculo da concentração de clorofila α foi feito usando-se o coeficiente de extinção determinado por Mac Kinney (1941).

Para a obtenção das razões N/P utilizadas nesse experimento, a concentração de fósforo foi mantida constante, enquanto que a de nitrogênio foi ajustada de modo a obter as diferentes razões (Tabela 2). Essas razões foram escolhidas a partir da análise dos valores de N/P da lagoa, durante o período que precedeu a mortandade de peixes, sendo que a razão de 10:1 representa o valor de N/P do meio ASM-1. O meio ASM-1 diluído 10 vezes foi também utilizado, no intuito de melhor retratar as concentrações de nutrientes encontradas na lagoa.

Tabela 2: Concentrações de uréia, nitrato e fosfato (μmol de nitrogênio/l) nos meios ASM-1 e ASM-1/10 com diferentes razões N/P.

N/P	ASM-1				ASM-1/10			
	2:1	3:1	4:1	10:1	2:1	3:1	4:1	10:1
Uréia	400	600	800	2000	40	60	80	200
Nitrato	400	600	800	2000	40	60	80	200
Fosfato	228	228	228	228	23	23	23	23

A partir destes testes preliminares, foram então estabelecidas as razões N/P de 3:1 e 10:1 e o nitrato como forma de nitrogênio em cultivos posteriores.

A razão N/P 30:1 foi também escolhida, já que Smith (1983) em um trabalho de revisão, utilizando dados de 17 lagos, sugere que a razão N/P igual a 29:1 representa uma "faixa limite" entre a região onde as cianobactérias tendem a dominar (N/P < 29) e a região onde sua ocorrência no ambiente é rara (N/P > 29:1).

Para o estudo das atividades fotossintética e respiratória, foram realizados experimentos iniciais no intuito de determinar o tempo de duração das incubações de amostras das culturas. A variação da concentração de oxigênio em frascos claros e escuros foi determinada em diferentes tempos de incubação (1, 2, 3 e 4 horas) para células em meio ASM-1, N/P 10:1, usando-se o método de Winkler, descrito em Strickland & Parsons (1968),

3.2 - Experimentos sobre o estudo ecofisiológico de *S. aquatilis* f. *salina*

Foram então realizados experimentos onde *S. aquatilis* f. *salina* foi cultivada em meio ASM-1 normal e meio ASM-1/10, com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. Essas culturas foram submetidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas e iluminação de $40 \mu\text{mol}$ de fluxo de fótons $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provenientes de tubos de lâmpadas frias, com pH inicial do meio igual a 8.

Esses experimentos começaram com a exaustão das reservas nitrogenadas das células utilizadas como inóculo. Esse procedimento é necessário para assegurar que o crescimento observado em cada um dos meios, com diferentes razões N/P, foi sustentado

sem nutrientes oferecidos e não pelas reservas intracelulares. As células do inóculo foram concentradas por centrifugação e lavadas com meio ASM-1 sem nitrogênio, sendo resuspensas em 1 litro desse mesmo meio. As células permaneceram nesse meio sem nitrogênio por 6 dias, tendo sido observado um aumento no número de células por mililitro de 32% em média, apesar da cultura se tornar levemente amarelada. O número de células inicialmente transferido para o meio sem nitrogênio foi sempre o mesmo, o que assegura que todas as células encontravam-se igualmente exauridas no início de cada experimento.

Após esses 6 dias, as células foram inoculadas em meio ASM-1 ou ASM-1/10, com razões N/P de 3:1, ou 10:1, ou 30:1. A densidade de células inicial nos cultivos foi sempre de 10^6 células. ml^{-1} . Todos os experimentos foram realizados em erlemmeyers de 5 litros, com 3 litros de meio e em triplicata de cada condição de cultivo, perfazendo um total de 18 cultivos. As culturas foram aeradas com ar filtrado em algodão e filtro de fibra de vidro esteréis. As amostragens das culturas foram realizadas com seringa de 60ml, sempre no período da manhã.

O crescimento foi monitorado por contagens diárias de células de amostras da cultura, de maneira já descrita anteriormente. Os dados de número de células por mililitros de meio foram então inseridos em uma escala logarítima para a elaboração da curva de crescimento. Foram também calculados os valores da taxa de crescimento e do tempo médio de duplicação, segundo Fogg & Thake (1987).

As amostras para análise de clorofila a , proteínas e carboidratos intracelulares e carboidratos extracelulares foram coletadas em dias alternados. Volumes variáveis de 1 a 10 ml da cultura foram concentrados por centrifugação, para análise de clorofila a , ou por filtração em filtros de fibra de vidro previamente calcinados a 400°C durante 4 horas, para

análise de proteínas e carboidratos. Essas amostras retidas nos filtros eram então congeladas a -15°C por períodos de no máximo 15 dias, antes de serem analisadas.

A concentração celular de clorofila *a* foi analisada por espectrofotometria, de maneira já descrita previamente, no mesmo dia da amostragem, evitando-se assim o congelamento da amostra.

As concentrações de carboidratos intracelulares e extracelulares foram determinadas pelo método de Dubois *et al.* (1956), precedido pelos procedimentos descritos por Myklestad & Haug (1972). A glicose foi usada na elaboração de uma curva padrão que foi utilizada no cálculo das concentrações das amostras.

A concentração intracelular de proteínas foi determinada segundo Bradford (1976). O cálculo das concentrações das amostras foi realizado através de uma curva padrão de albumina.

Todos os dados foram normalizados para 10^6 células.

As atividades fotossintética e respiratória foram avaliadas duas vezes durante o crescimento das culturas: 1°) Na fase exponencial de crescimento, que foi determinada por meio de regressão linear e 2°) No último dia de cultivo, que foi definido pela estabilização do número de células por mililitros de meio de cultura, caracterizando a fase estacionária.

Para a determinação das atividades fotossintética e respiratória foi analisada a variação da concentração de oxigênio em frascos claros e escuros durante 2 horas de incubação, pelo método de Winkler, descrito em Strickland & Parsons (1968). O amido foi utilizado na determinação do ponto final da titulação. Foram utilizados erlemmeyers de 25 ou 50 ml com tampa, claros e escuros, para a incubação de amostras (Figura 2). Nesses experimentos, as células foram submetidas a uma iluminação de $27 \mu\text{mol}$ de fluxo de fótons $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Como a análise da variação do oxigênio no claro e no escuro foi realizada

usando 6 réplicas de cada condição de cultivo (ver Figura 2), os valores mais discrepantes em cada condição foram retirados. Durante cada incubação foram também medidos os valores de pH inicial e final de todos os frascos nos cultivos em meio ASM-1. O acompanhamento da variação dos valores de pH em amostras no escuro não foi feito para os cultivos em meio ASM-1/10.

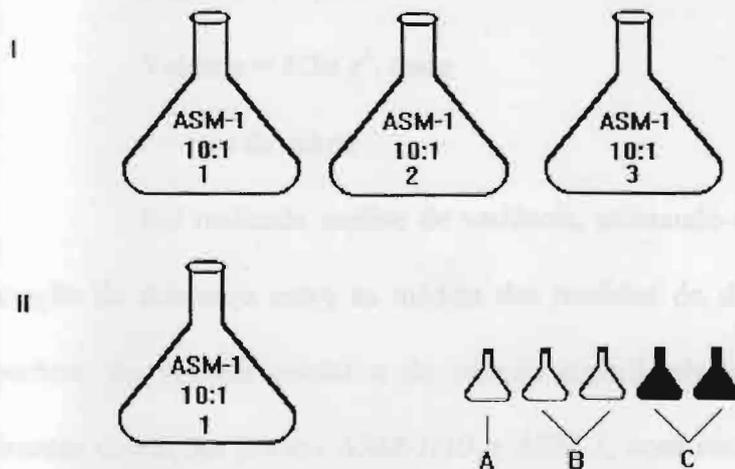


Figura 2: Experimento para análise das atividades fotossintética e respiratória de *S. aquatilis* f. *salina*. Em I temos as três réplicas da condição de cultivo por exemplo, ASM-1 10:1. A cada uma destas réplicas correspondem 5 erlenmeyers de 25 ou 50 ml, representados em II. Em II, o frasco A é utilizado para a determinação da concentração de oxigênio presente antes da incubação (oxigênio inicial), e os frascos B e C são utilizados para a determinação da concentração de oxigênio ao final de 2 horas de incubação a $27 \mu\text{mol}$ de fluxo de fótons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ e no escuro, respectivamente.

Essas incubações foram realizadas 3 vezes no dia, nos seguintes horários: De 6:30 às 8:30, de 11:30 às 13:30 e de 16:30 às 18:30h. Os dados foram então divididos pela concentração de clorofila α , amostrada na manhã do dia do experimento.

Após o experimento de determinação da atividade fotossintética e respiratória na fase estacionária do crescimento em cada condição de cultivo, as células foram fotografadas em microscópio ótico com aumento de 1000 vezes. As fotografias das células foram então medidas com auxílio de um paquímetro, para verificar uma possível mudança no

tamanho celular nas diferentes condições de cultivo. As células escolhidas para essas medidas não estavam em processo de divisão celular. A partir da medida do diâmetro da célula, foram então calculadas a área da superfície da célula, o volume celular e a relação superfície/volume, através das seguintes equações, escolhidas a partir da forma da célula (esfera):

$$\text{Superfície} = 4\pi r^2$$

$$\text{Volume} = 4/3\pi r^3, \text{ onde}$$

r = raio da célula

Foi realizada análise de variância, utilizando-se o programa "Statistica", para avaliação da diferença entre as médias das medidas do diâmetro das células, da área da superfície, do volume celular e da relação superfície/volume, das células cultivadas nas diferentes condições (meios ASM-1/10 e ASM-1, com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1). Essa análise apresentou resultado significativo, ao nível de significância de 5%. A partir daí, foi realizado o Teste de Duncan, com o intuito de identificar as médias que foram consideradas significativamente diferentes.

No final de cada cultivo, as células restantes nos frascos foram lavadas com água deionizada e concentradas por centrifugação, sendo então congeladas a -15°C para posterior liofilização. As células liofilizadas foram então submetidas a testes de imunoenaios, pelo método Elisa (Enzyme linked immunoabsorbent assay), descrito por Chu (1989 e 1990), realizados no laboratório do Prof. Dr. Wayne W. Carmichael, W.S.U., Ohio, EUA, para análise da concentração de microcistinas (hepatotoxinas produzidas por cianobactérias).

Foram calculados os valores das médias e desvios padrões de cada parâmetro analisado, em cada condição de cultivo, para uma melhor comparação dos resultados.

Nos cultivos em meio ASM-1/10, N/P 3:1 uma das triplicatas apresentou um crescimento muito diferente e assim não foi incluída nos cálculos. Desse modo todos os parâmetros analisados neste cultivo serão mostrados aqui como médias de dois valores.



Figura 3: Foto dos cultivos em meio ASM-1/10, com razões N/P 10:1 e 30:1. Reparar na coloração bastante diferente das duas culturas.

4 - Resultados e Discussão

4.1- Análise de correlação entre as concentrações de nutrientes e a dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra

Tabela 3: Análise de correlação de Pearson realizada entre as variáveis da coluna 1 e: a densidade de *S. aquatilis* f. *salina* (*Syne/ml*), a densidade de cianobactérias (*ciano/ml*) e a biomassa de cianobactérias (%*Cciano*). Correlações marcadas são significativas a $p < 0.05$

<i>Variável</i>	<i>Syne/ml</i>	<i>ciano/ml</i>	% <i>Cciano</i>
NH ₄	.41 *	.33 *	-.06
NO ₃ +NO ₂	-.21	-.24	-.36 *
PO ₄	.09	.12	-.03
NID	.39 *	.30 *	-.11
NID/PO ₄	-.10	-.18	-.38 *
NOP/POP	-.22	-.26 *	-.35 *
NO ₃ /PT	-.23	-.28 *	-.39 *
NT/PT	-.30 *	-.37 *	-.40 *
Salinidade	-.28 *	-.37 *	-.56 *
pH	.17	.31 *	.60 *

A análise de correlação que apresentou um maior número de resultados significativos ($p < 0.05$) foi em relação à porcentagem do carbono fitoplanctônico na fração

das cianobactérias (biomassa de cianobactérias) (Tabela 3). Ficou evidenciada uma correlação significativa negativa entre a biomassa de cianobactérias e os seguintes fatores: as concentrações de nitrato+nitrito, as razões NID/PO₄, NOP/POP, NO₃/PT e NT/PT, além da salinidade. A única correlação positiva encontrada foi em relação ao pH. Não foi observada correlação significativa entre a biomassa de cianobactérias e as concentrações de amônia, fosfato e nitrogênio inorgânico dissolvido.

Desse modo, a ocorrência de cianobactérias na Lagoa da Barra parece estar associada à baixas concentrações de nitrato e nitrito, baixas concentrações de nitrogênio em relação ao fósforo, tanto na fração dissolvida quanto na particulada, baixos valores de salinidade e altos valores de pH. Este resultado mostra que a tendência observada por Domingos *et al.* (no prelo) de dominância de cianobactérias associada a carência em nitrogênio durante o período de Outubro de 1990 a Junho de 1991 parece ser uma característica de todo o período estudado.

Estes dados concordam com os modelos de Smith (1983 e 1985), que associam a ocorrência de cianobactérias a baixas razões NT/PT. A correlação negativa encontrada em relação a razão NO₃/PT concorda com o modelo descrito por McQueen & Lean (1987). Além disso, a ocorrência de cianobactérias associada à presença de nitrogênio na forma de amônia sugerida por Blomqvist *et al.* (1994) também parece se aplicar na Lagoa da Barra, em virtude da correlação negativa existente em relação às concentrações de nitrato e nitrito. Apesar de não ter havido correlação significativa entre a concentração de amônia e a biomassa de cianobactérias, houve correlação positiva significativa entre a concentração de amônia e a densidade de cianobactérias e da espécie *S. aquatilis* f. *salina* na comunidade fitoplanctônica da lagoa. Vale ressaltar que Pereira-Filho (1995) também relacionou a dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra a períodos de baixas concentrações de

nitrato em análise de agrupamento dos dados de todo o período do estudo. A ocorrência de cianobactérias associada a altos valores de pH já foi amplamente relatada (Shapiro, 1990), tendo sido proposta por Domingos *et al.* (no prelo) para o período entre Outubro de 1990 e Junho de 1991 na Lagoa da Barra.

A disponibilidade de nitrogênio e sua limitação em relação ao fósforo, tanto na fração dissolvida quanto na particulada, se mostraram então muito bem correlacionados à ocorrência de cianobactérias na Lagoa da Barra. Estas variáveis parecem ter sido os fatores limitantes que proporcionaram a dominância das cianobactérias durante a maior parte do estudo. O fator limitante é o recurso essencial que está presente em quantidades próximas ao valor crítico mínimo que o organismo necessita, agindo frequentemente como um fator controlador, determinando o sucesso do organismo em um dado ambiente (Darley, 1982).

4.2- Experimentos para definição das condições de cultivo

Os resultados dos experimentos inicialmente realizados para determinação das condições de cultivo a serem utilizadas no estudo ecofisiológico de *S. aquatilis* f. *salina* se encontram nas Tabelas 4, 5 e 6. O cultivo em nitrato foi usado como controle em todos estes experimentos.

A taxa de crescimento (μ) e o tempo médio de duplicação (G) mostraram que as células mantidas em meio com amônia cresceram mais rapidamente que as células cultivadas em meio com nitrato (Tabela 4). No entanto, a duração da fase de crescimento exponencial (Exp) e o rendimento máximo (Rend Max), que representa o número máximo de células atingido por cada cultura, foram maiores para as células no meio com nitrato. Além disso,

após o 9º dia de cultivo, as células em meio com amônia mostraram-se completamente despigmentadas, e por isso este experimento teve duração somente de 10 dias.

Tabela 4: Valores da taxa de Crescimento (μ), tempo médio de duplicação (G), tempo de duração da fase de crescimento exponencial (Exp) em dias e rendimento máximo da cultura (Rend Max) expresso em número de células de *S. aquatilis* f. *salina* por mililitro de meio, contendo amônia ou nitrato como fonte nitrogenada.

	Amônia	Nitrato
μ	0.48	0.30
G	1.43	2.32
Exp	4	8
Rend Max	5640000	8990000

Segundo Syrett (1981) e Thompson *et al.* (1989), as maiores taxas de crescimento observadas em células crescidas em meio com amônia, comparativamente àquelas cultivadas em nitrato, podem ser atribuídas à redução do nitrogênio, requerida nas células que utilizam o nitrato. Este processo compete com o ciclo de redução do carbono e com a manutenção das reservas de enzimas como a Rubisco por poder redutor. Ward & Wetzel (1980) também relataram maiores taxas de crescimento para espécies de cianobactérias cultivadas em meio com amônia, em relação às células em meio com nitrato, em diferentes intensidades luminosas.

Gohram *et al.* (1964) já chamavam a atenção à utilização da amônia ou uréia como fonte de nitrogênio em meio não tamponado, relatando que apesar do crescimento inicial ser rápido, é logo interrompido devido à lise celular. Syrett (1981) e Fogg & Thake (1987) ressaltaram o fato de que a assimilação do íon amônio causa uma acidificação do meio, comprometendo a continuidade do crescimento da alga.

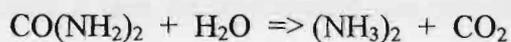
Geider e Osborne (1992) demonstraram que para cada íon amônio assimilado, um H^+ é liberado para o meio de cultivo, segundo a equação que se segue:



Podemos ver que a assimilação de amônia leva à uma diminuição do pH do meio, o que provavelmente afetou o crescimento desta espécie ao longo do experimento, visto que as cianobactérias são organismos mais frequentemente associados a ambientes de pH neutro a alcalino. Brock (1973) conclue que existe uma “barreira ácida” que limita a ocorrência de cianobactérias em ambientes de pH ácido. Em especial, o autor chama atenção para o fato de que a clorofila é degradada à feofitina em condições ácidas. Desse modo, a despigmentação observada nas células cultivadas em meio com amônia pode ser atribuída à acidificação do meio, causada pela assimilação de amônia.

Vale lembrar que na Lagoa da Barra foi obtida correlação significativa e positiva entre o pH da água e a biomassa de cianobactérias. Além disso, a queda brusca da densidade e biomassa de cianobactérias, que ocorreu após a mortandade de peixes foi atribuída por Domingos *et al.* (no prelo) à diminuição nos valores do pH do meio.

Desta maneira, o problema da redução do pH do meio ocasionado pela assimilação de amônia, inviabilizou a utilização deste nutriente como fonte nitrogenada. A uréia foi então testada como forma de nitrogênio disponível a esta espécie. No entanto, sua assimilação pela célula também ocasiona uma diminuição no pH do meio, já que libera CO_2 , como pode ser visto nas equações extraídas de Geider e Osborne (1992).



No caso da assimilação do nitrato há um aumento do pH do meio:



Tabela 5: Valores da taxa de Crescimento (μ), tempo médio de duplicação (G), tempo de duração da fase de crescimento exponencial (Exp) em dias e rendimento máximo (Rend Max) expresso em número de células de *S. aquatilis* f. *salina* por mililitros de meio contendo uréia ou nitrato como fonte nitrogenada.

	Uréia	Nitrato
μ	0.23	0.25
G	3.01	2.74
Exp	10	15
Rend Max	11985000	74107500

Como pode ser visto na Tabela 5, a diferença nos valores do rendimento máximo (Rend Max) e do tempo de duração da fase de crescimento exponencial (Exp) mostraram que, apesar da taxa de crescimento (μ) ter sido praticamente a mesma para as duas culturas, as células crescidas em meio com uréia foram incapazes de manter o crescimento exponencial durante muito tempo, não atingindo o número de células encontrado nas culturas com nitrato. Este fato está provavelmente associado à acidificação do meio, causada pela assimilação da uréia. A diferença encontrada entre as variáveis referentes ao cultivo em meio com nitrato na Tabela 4 e na 5 se deve ao tempo de duração dos experimentos, de 9 e 21 dias, respectivamente.

No terceiro experimento, foi observado mais uma vez um rendimento máximo superior nos cultivos em meio com nitrato, em relação aos cultivos em meio com uréia (Tabela 6). Nesse experimento a taxa de crescimento das células em meio com nitrato foi subestimada, visto que a fase de crescimento exponencial dessas células foi provavelmente além do 7º dia do cultivo.

Tabela 6: Valores da taxa de crescimento (μ) em dias, clorofila a em $\mu\text{g}\cdot 10^{-6}$ células e rendimento máximo (Rend Max) em número de células. ml^{-1} , do experimento para determinação das razões N/P a serem utilizadas em cultivos posteriores. nd - não detectável

Fonte de Nitrogênio	Meio de cultivo e Razão N/P	μ	Clorofila 7° dia	Clorofila 14° dia	Rend Max
URÉIA	ASM-1/10				
	2:1	0.15	0.04	nd	3570833
	3:1	0.17	0.05	nd	3912500
	4:1	0.16	0.04	0.01	3787500
	10:1	0.24	0.06	0.04	8061667
	ASM-1				
	2:1	0.28	0.08	0.05	14743333
	3:1	0.29	0.09	0.07	16905000
	4:1	0.29	0.10	0.07	14746250
	10:1	0.28	0.13	0.15	18470833
NITRATO	10:1	0.22	0.11	0.08	49680000

Nesse experimento foram então estabelecidas as razões N/P de 3:1 e 10:1 e o nitrato como forma de nitrogênio para os cultivos posteriores.

A Tabela 7 mostra o resultado do experimento realizado para a determinação do tempo de duração das incubações nos experimentos de análise das atividades fotossintética e respiratória. O tempo de 2 horas foi escolhido por ter sido observado nesse intervalo de tempo uma variação mensurável da concentração de oxigênio nos frascos claros e escuros. Tempos de incubação maiores foram evitados devido a: 1)- o efeito do "confinamento" ("bottle effect"), que é pronunciado em amostras de pequeno volume, como as aqui utilizadas; 2)- para evitar a supersaturação em oxigênio e 3)- para possibilitar a realização das incubações 3 vezes no dia.

Tabela 7: Variação da concentração de oxigênio ($\mu\text{mol/l}$) em frascos claros e escuros durante diferentes tempos de incubação, em meio ASM-1, N/P 10:1.

	N° céls.ml ⁻¹			
	51315000 céls.ml ⁻¹		14575000 céls.ml ⁻¹	
Tempo de incubação(h)	Variação do O ₂		Variação do O ₂	
	Claro	Escuro	Claro	Escuro
1	+146.3	-	+53.3	-3.4
2	+117.1	-	+89.3	-13.2
3	+128.1	-28.2	+93.9	-4.0
4	+73.6	-21.9	+111.4	-

4.3- Estudo ecofisiológico de *S. aquatilis f. salina*

4.3.1 - Crescimento

As Figuras 4 e 5 evidenciam uma diferença marcante no crescimento de *S. aquatilis f. salina* em meio ASM-1/10 e ASM-1, em termos da velocidade de crescimento (inclinação da reta), rendimento máximo da cultura e duração da fase de crescimento exponencial. As células cultivadas em meio ASM-1/10 tiveram uma curta fase de crescimento exponencial, atingindo a fase estacionária em no máximo 7 dias, apresentando assim um rendimento máximo bem inferior ao dos cultivos em meio ASM-1 (Tabela 8).

Segundo Zevenboom (1987), a taxa de crescimento limitada por um nutriente é o resultado final da capacidade celular de absorver, transportar e assimilar o nutriente limitante ou de usar suas reservas celulares. Através da regulação de enzimas especificamente envolvidas nos vários estágios da interação da célula com o ambiente (nutriente), a célula é capaz de obter determinadas taxas de crescimento.

As células cultivadas no meio ASM-1/10 com razão N/P 3:1 tiveram seu crescimento comparativamente muito prejudicado (Figura 4), como indica sua menor taxa de crescimento e maior tempo médio de duplicação. Além disso, o rendimento máximo atingido pela cultura foi muito baixo, representando um valor cerca de 11 vezes menor ao obtido por células cultivadas no meio ASM-1, N/P 10:1. Isto se deve principalmente à baixa concentração de nitrogênio no meio, que parece não ter sido suficiente para que as células, que já vinham de uma condição de limitação severa por este nutriente, causada pela permanência durante 6 dias em meio sem fonte de nitrogênio, se recuperassem.

Tabela 8: Taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação (G) em dias. Rendimento máximo (Rend Max) expresso em número de células de *S. aquatilis* f. *salina* por mililitros. Valores médios, calculados a partir de triplicatas de cada condição de cultivo.

Meio	Razão N/P	μ	G	Rend Max
ASM-1/10	3:1	0.27	2.60	3770625
	10:1	0.40	1.74	9565000
	30:1	0.43	1.62	11205833
ASM-1	3:1	0.33	2.10	29705000
	10:1	0.37	1.87	42161667
	30:1	0.36	1.92	12191111

Kana *et al.* (1992) observaram que 3 diferentes cepas de *Synechococcus* apresentaram crescimento exponencial enquanto o nitrato foi detectável no meio de cultura. Este crescimento foi interrompido logo após a exaustão deste nutriente no meio. Caperon (1968) ressalta que a assimilação de um determinado nutriente por células exauridas é bastante rápida, enquanto a taxa de crescimento não aumenta na mesma escala.

A limitação em micronutrientes, que se encontravam em concentrações muito menores no meio ASM-1/10, também deve ser considerada. Em especial, a concentração de ferro era muito baixa (0,4 $\mu\text{mol/l}$). Murphy & Lean (1975) explicam a ausência de cianobactérias no lago St. George a partir das baixas concentrações de ferro, na faixa entre 0.36 e 0.9 $\mu\text{mol/l}$. Além disso, considerando-se que os dois processos mais dispendiosos em termos energéticos para a célula, a redução fotossintética do carbono e a redução do nitrogênio, dependem de compostos que contêm ferro (Rueter & Petersen, 1987), pode-se inferir as consequências de sua limitação à célula.

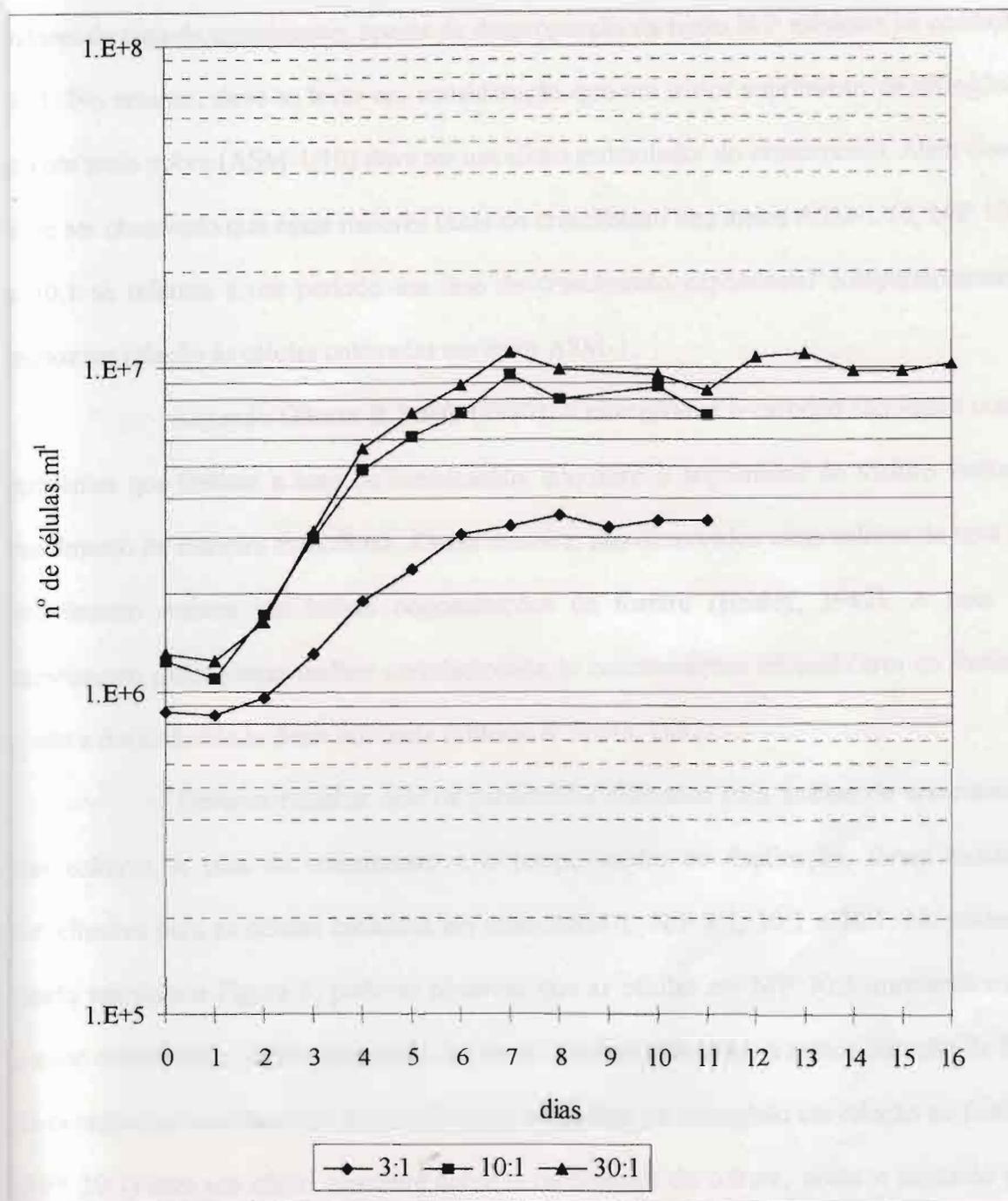


Figura 4: Curva de crescimento de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1/10, com diferentes razões N/P.

As células cultivadas no meio ASM-1/10 com razão N/P 10:1 e 30:1 obtiveram valores de tempo médio de duplicação e rendimento máximo praticamente iguais. Um fato interessante é que as células cultivadas nestas condições apresentaram os maiores

valores de taxa de crescimento, apesar da desproporção da razão N/P existente na condição 30:1. No entanto, deve-se levar em consideração que um maior suprimento de nitrogênio em um meio pobre (ASM-1/10) deve ter um efeito estimulador do crescimento. Além disso, deve ser observado que essas maiores taxas de crescimento nos meios ASM-1/10, N/P 10:1 e 30:1 se referem a um período em fase de crescimento exponencial comparativamente menor em relação às células cultivadas em meio ASM-1.

Segundo Gibson & Smith (1982), o nitrogênio e o carbono são vistos como nutrientes que limitam a taxa de crescimento, enquanto o suprimento de fósforo limita o rendimento de maneira mais direta. Dessa maneira, são observados altos valores de taxa de crescimento mesmo em baixas concentrações de fosfato (Healey, 1982). A taxa de crescimento parece estar melhor correlacionada às concentrações intracelulares de fósforo, e não a disponibilidade deste nutriente (Gibson & Smith, 1982).

Deve-se ressaltar que os parâmetros utilizados para análise do crescimento das culturas, a taxa de crescimento e o tempo médio de duplicação, foram bastante semelhantes para as células crescidas em meio ASM-1, N/P 3:1, 10:1 e 30:1. No entanto, tendo em vista a Figura 5, pode-se observar que as células em N/P 30:1 apresentaram o menor crescimento, como mostraram a menor inclinação da reta e a menor duração da fase de crescimento exponencial. A concentração exagerada de nitrogênio em relação ao fósforo (N/P 30:1) teve um efeito marcante sobre o rendimento da cultura, como o sugerido por Gibson & Smith (1982), provavelmente devido a uma limitação em fósforo em relação ao nitrogênio, causada por um desequilíbrio na razão N/P.

Esses dados provaram que esta espécie é capaz de manter um bom crescimento em condições de baixas concentrações de nitrogênio no meio, quando os demais nutrientes necessários se encontram disponíveis, como mostraram as células cultivadas em ASM-1, N/P 3:1, quando comparadas às cultivadas em N/P 10:1 (Figura 5).

Deve-se ressaltar que este crescimento foi sustentado realmente pelo nitrogênio disponível no meio e não por reservas intracelulares deste nutriente, como muitas vezes relatado. Estas células mantiveram uma boa taxa de crescimento enquanto havia nitrogênio. Esta taxa diminuiu a partir do momento em que o nitrogênio foi consumido pela cultura. Isto diminuiu a duração da fase de crescimento exponencial, prejudicando o rendimento máximo da cultura.

Segundo Fogg & Thake (1987), o efeito de um baixo suprimento de um nutriente particular em uma cultura é diminuir o tempo de duração da fase de crescimento exponencial, ao invés de diminuir a taxa de crescimento, como o observado nas células cultivadas em meio ASM-1, N/P 3:1 e 30:1 e meio ASM-1/10.

O dado mais contrastante entre as culturas e portanto mais esclarecedor, foi o rendimento máximo. Este dado possibilitou uma ordenação das três condições de cultivo no meio ASM-1, da mais favorável ao crescimento da espécie, N/P 10:1, à menos favorável, N/P 30:1, sendo que a N/P 3:1 ocupa posição intermediária.

A Tabela 9 mostra as taxas de crescimento de *Microcystis aeruginosa*, (Aguiar, 1995) e *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Andrade *et al.*, 1994), como parâmetro de comparação. Pode-se notar que também para a espécie *Microcystis aeruginosa* o efeito de um menor suprimento de nitrogênio teve um efeito mais acentuado no rendimento máximo da cultura do que na taxa de crescimento. Aguiar (1995) encontrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o rendimento máximo da cultura em meio ASM-1, N/5 e o da cultura em meio ASM-1 normal, mas não entre a taxa de crescimento das células nos dois cultivos. A diferença encontrada entre as taxas de crescimento de *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* e *Microcystis aeruginosa* pode ser atribuída à diferença de tamanho entre estas células.

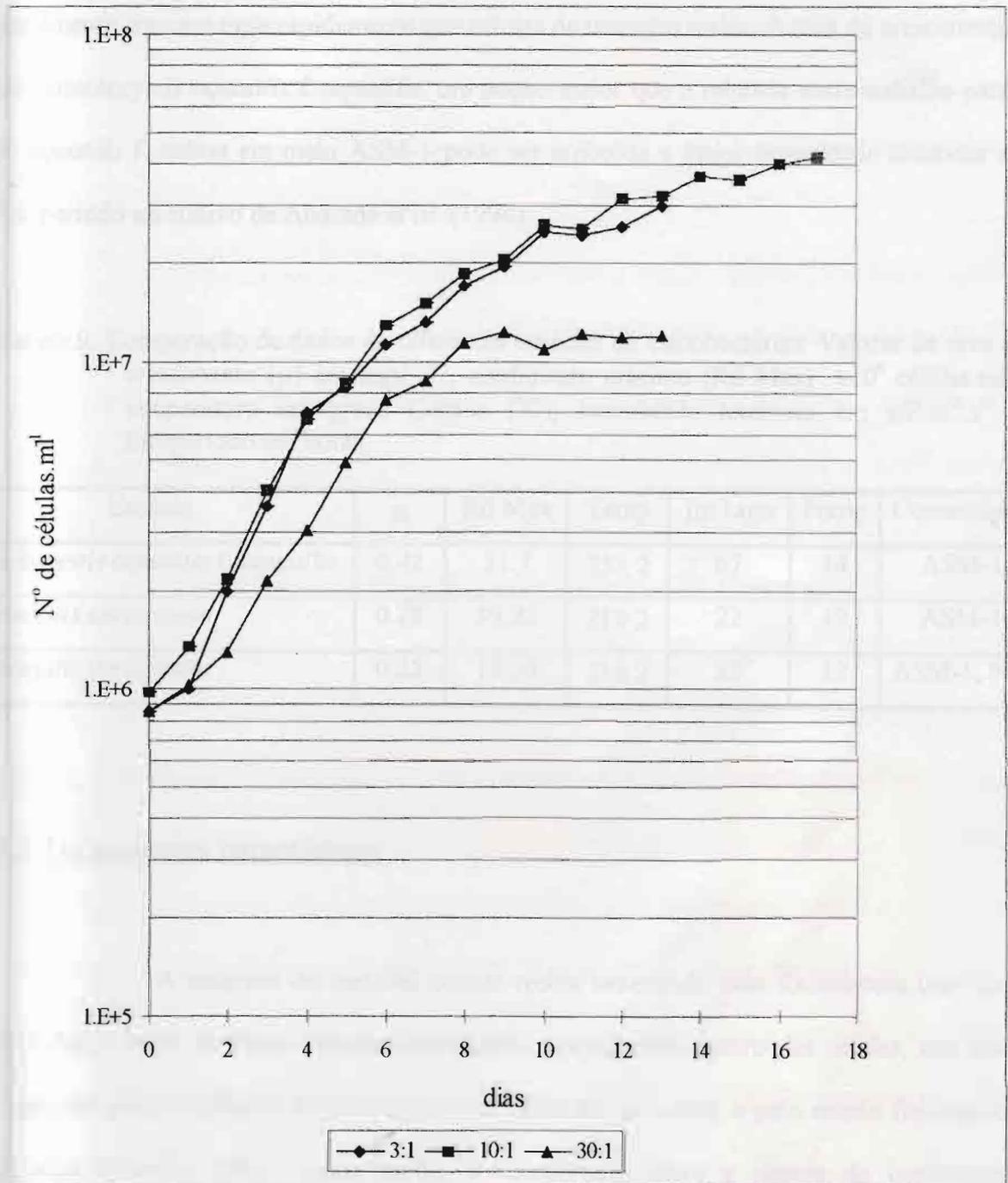


Figura 5: Curva de crescimento de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1, com diferentes razões N/P.

Foy (1980), concluiu que apesar da taxa de crescimento depender de fatores metabólicos e fisiológicos, ela é também correlacionada positivamente com a relação superfície/volume. Células menores tem uma relação superfície/volume maior e assim

geralmente crescem mais rapidamente que células de tamanho maior. A taxa de crescimento de *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*, um pouco maior que a relatada neste trabalho para *S. aquatilis* f. *salina* em meio ASM-1 pode ser atribuída a maior intensidade luminosa e fotoperíodo no cultivo de Andrade *et al.* (1994).

Tabela 9: Comparação de dados de diferentes espécies de cianobactérias. Valores da taxa de crescimento (μ) em $\log_N \cdot d^{-1}$, rendimento máximo (Rd Max) $\times 10^6$ células.ml⁻¹, temperatura em graus Celsius (°C), intensidade luminosa em $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ e fotoperíodo em horas.

Espécie	μ	Rd Max	Temp	Int Lum	Fotop	Comentários
<i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>aquatilis</i>	0.42	31.7	25 \pm 2	67	14	ASM-1
<i>Synechocystis aeruginosa</i>	0.28	19.23	21 \pm 2	22	12	ASM-1
<i>Synechocystis aeruginosa</i>	0.25	11.30	21 \pm 2	22	12	ASM-1, N/5

4.3.2 - Compostos Intracelulares

A natureza do material celular recém sintetizado pela fotossíntese depende do balanço entre as várias reações metabólicas que ocorrem dentro das células, que são reguladas pelas condições ambientais prevalentes no momento, e pelo estado fisiológico da alga (Morris, 1981). Deste modo, a comparação entre a síntese de compostos essencialmente ligados ao crescimento como proteínas, e a síntese de compostos de armazenamento como lipídios e polissacarídeos assume grande relevância no estudo ecofisiológico do fitoplâncton (Morris, 1981).

As Figuras 6, 7, 8 e 9 mostram a variação das concentrações de carboidratos e proteínas intracelulares durante os cultivos em meio ASM-1/10 e ASM-1. Pode-se notar

que os valores mais altos de carboidratos intracelulares foram observados no primeiro dia do cultivo, com exceção das células cultivadas em meio ASM-1, N/P 30:1. Concomitantemente, os menores valores de proteínas, não detectáveis pelo método utilizado, foram observados também neste dia.

Estes elevados valores de carboidratos e baixos valores de proteínas na fase inicial do cultivo refletiram a condição de carência em nitrogênio vivenciada pelas células do inóculo. Deve-se lembrar que estas células foram cultivadas durante 6 dias em meio sem adição de nitrogênio, no intuito de que houvesse justamente o consumo de suas reservas nitrogenadas.

Com a falta de nitrogênio no meio, a síntese protéica é inibida e as reservas nitrogenadas intracelulares começam a ser degradadas. No caso das cianobactérias, as cianoficinas são primeiramente degradadas, seguindo-se a degradação das ficobiliproteínas (Allen & Hutchinson, 1980, Syrett, 1981, Weisshaar & Boger, 1983, Van Rijn & Shilo, 1986, Bryant, 1987, Fogg & Thake, 1987, Allen *et al.*, 1990, Duke & Allen, 1990, Turpin, 1991, Kana *et al.*, 1992, Foy, 1993), da clorofila *a*, além de enzimas ligadas a fotossíntese (Allen *et al.*, 1990, Duke & Allen, 1990, Turpin, 1991). Além disso, com a falta de nitrogênio do meio, a via metabólica preponderante, que é a de síntese de proteínas, é alterada para a via produtora de compostos de reserva não nitrogenados, como carboidratos (Myklestad & Haug, 1972, Foy & Smith, 1980, Morris, 1981, Lapointe & Duke, 1984, Van Rijn & Shilo, 1986, Zevenboom, 1987, Allen *et al.*, 1990, Duke & Allen, 1990, Harrison *et al.*, 1990, Turpin, 1991).

A degradação das ficobiliproteínas é geralmente vista como uma maneira de redistribuir o nitrogênio celular durante a sua limitação, deslocando-o dos pigmentos que captam luz para a síntese de proteínas novas. Everest *et al.* (1986) sugerem que esse nitrogênio celular que é redistribuído durante a limitação em nitrogênio é usado na síntese

de enzimas que aumentem a eficiência de assimilação deste nutriente. Kana *et al.* (1992) sugerem que esta redução das ficobiliproteínas também pode ser vista como um mecanismo adaptativo para reduzir a absorção de energia luminosa quando a utilização dos produtos da fotossíntese é restrita.

Segundo Morris (1981), algas microscópicas são em essência, organismos sintetizadores de proteínas, com uma grande diversidade metabólica que permite a predominância de outras vias metabólicas sobre a via preferencial produtora de proteína, em determinadas condições.

As elevadas concentrações iniciais de carboidratos sofreram uma diminuição marcante logo nos primeiros dias de cultivo tanto em meio ASM-1/10 quanto em ASM-1 (Figuras 6 e 7). Esta queda no conteúdo de carboidratos foi acompanhada por um aumento considerável na concentração de proteínas (Figuras 8 e 9), o que mostra a rápida assimilação de nitrogênio pelas células exauridas deste nutriente.

Numa condição de crescimento limitado por um determinado nutriente, o estoque interno desse nutriente é baixo, mas a afinidade pela sua absorção e/ou o conteúdo celular do sistema de absorção é alto. Assim, a célula exibe uma alta taxa inicial de absorção deste nutriente quando este lhe é oferecido (Zevenboom, 1987). O efeito líquido na célula será de aumentar sua capacidade de absorção do nutriente limitante e também sua capacidade de competir com sucesso com outros organismos.

O carboidrato acumulado deve ter sido parcialmente consumido pela respiração, que tende a aumentar durante a rápida assimilação de nitrogênio, e principalmente convertido em compostos orgânicos nitrogenados, como as proteínas (Syrett, 1981). Estas proteínas são então utilizadas na síntese de compostos que permitam a divisão celular, e conseqüentemente o crescimento da população.

Durante o período correspondente a fase de crescimento exponencial, foi observada a queda das concentrações de carboidratos e aumento de proteínas, indicando um momento de produção de materiais celulares novos e crescimento da população (Figuras 6, 7, 8 e 9). O padrão metabólico característico desta fase é de uma alta capacidade fotossintética dedicada à produção de proteínas e outros constituintes protoplasmáticos envolvidos no crescimento (Fogg & Thake, 1987). No entanto, a proporção de proteínas sobre o material celular total é afetada pelas condições de cultivo.

A medida que os nutrientes do meio foram sendo consumidos, as células entraram na fase estacionária do crescimento, que é caracterizada pelo aumento da produção de compostos de reserva, como carboidratos, já que o meio não mais propicia o crescimento da população. Este aumento nas concentrações de carboidratos foi de fato observado nas células cultivadas no meio ASM-1, e de maneira mais pronunciada nas células em razão N/P 30:1, talvez em função desta alta razão N/P, que se mostrou prejudicial ao crescimento desta espécie (Figura 7). Já nas células cultivadas no meio ASM-1/10 (Figura 6), esse aumento dos carboidratos só não foi observado nas células em razão NP 30:1, onde provavelmente a maior disponibilidade de nitrogênio ainda permitia uma síntese protéica adequada, como pode ser observado na Figura 8. Por outro lado, esse aumento foi mais pronunciado nas células em razão N/P 3:1, devido provavelmente a forte limitação em nitrogênio vivenciada por essas células, principalmente no final do cultivo.

Nas células cultivadas em meio ASM-1/10 N/P 3:1, a concentração de nitrogênio parece não ter sido suficiente para permitir uma produção considerável de proteínas, o que deve ter prejudicado seu desenvolvimento (Figura 8). Estas células foram

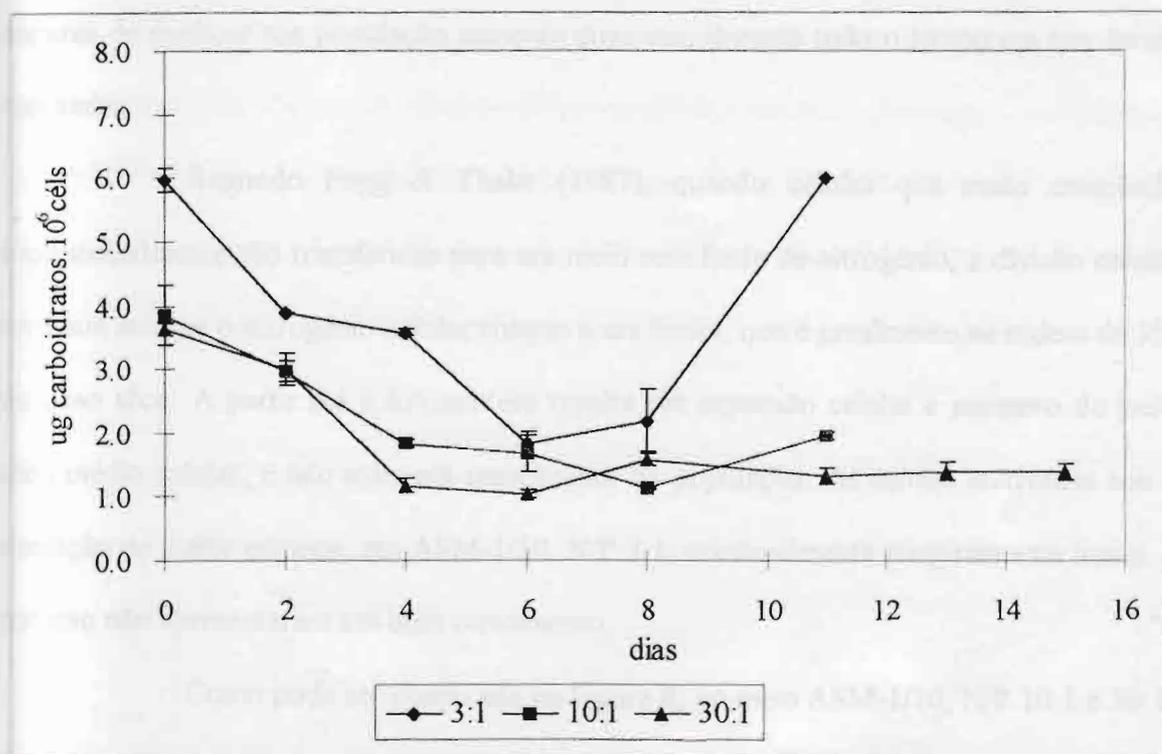


Figura 6: Variação das concentrações de carboidratos intracelulares de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1/10 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

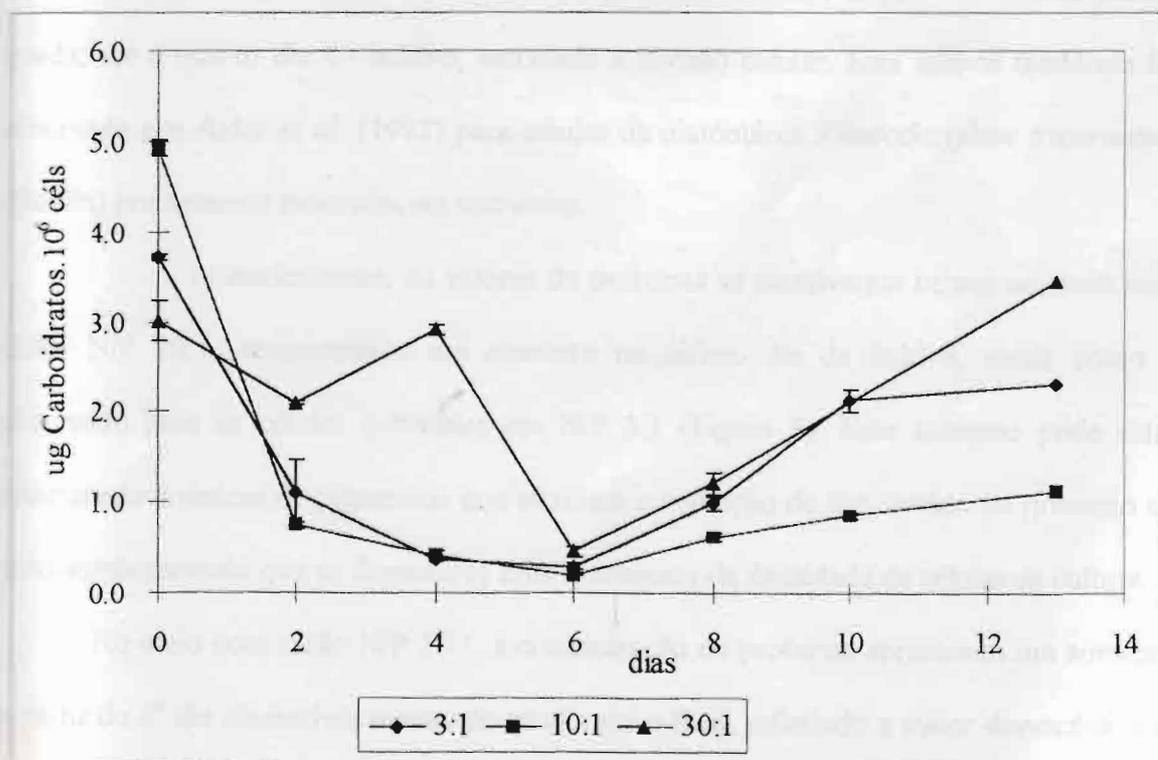


Figura 7: Variação das concentrações de carboidratos intracelulares de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

capazes de duplicar sua população somente duas vezes, durante todo o tempo em que foram cultivadas.

Segundo Fogg & Thake (1987), quando células que estão crescendo exponencialmente são transferidas para um meio sem fonte de nitrogênio, a divisão celular continua até que o nitrogênio celular chegue a um limite, que é geralmente na ordem de 3% do peso seco. A partir daí a fotossíntese resulta em expansão celular e aumento do peso médio celular, e não mais em crescimento da população. As células cultivadas sob a condição de maior estresse, em ASM-1/10, N/P 3:1, provavelmente atingiram este limite, e por isso não apresentaram um bom crescimento.

Como pode ser observado na Figura 8, no meio ASM-1/10, N/P 10:1 e 30:1, houve um aumento acentuado nas concentrações de proteínas até o segundo dia do cultivo, caracterizando os valores máximos observados em todas as condições e retratando a rápida assimilação de nitrogênio por estas células. Após este aumento inicial, houve uma grande queda, até o quarto dia do cultivo, associada à divisão celular. Esta mesma tendência foi observada por Aidar *et al.* (1991) para células da diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin) previamente exauridas em nutrientes.

Posteriormente, os valores de proteínas se mantiveram baixos no meio com razão N/P 10:1, apresentando um aumento no último dia de cultivo, assim como o observado para as células cultivadas em N/P 3:1 (Figura 8). Este aumento pode estar relacionado à síntese de pigmentos que auxiliam a captação de luz, devido ao processo de auto-sombreamento que se desenvolve com o aumento da densidade de células da cultura.

No meio com razão N/P 30:1, a concentração de proteínas apresentou um aumento a partir do 6º dia de cultivo, mantendo-se alta até o final, refletindo a maior disponibilidade de nitrogênio (Figura 8). Essa maior concentração de nitrogênio no meio, teria permitido uma maior síntese de pigmentos acessórios, que são importantes nesse momento, quando o

aumento do número de células na cultura provavelmente levou a um processo de autosombreamento. Segundo Rhee (1978), em células sofrendo limitação de fósforo, o excesso de nitrogênio é acumulado na forma de proteínas. No meio ASM-1/10, N/P 30:1 ocorreu provavelmente uma limitação por outros nutrientes que não permitiu a continuação do crescimento, visto que as células entraram na fase de crescimento estacionário.

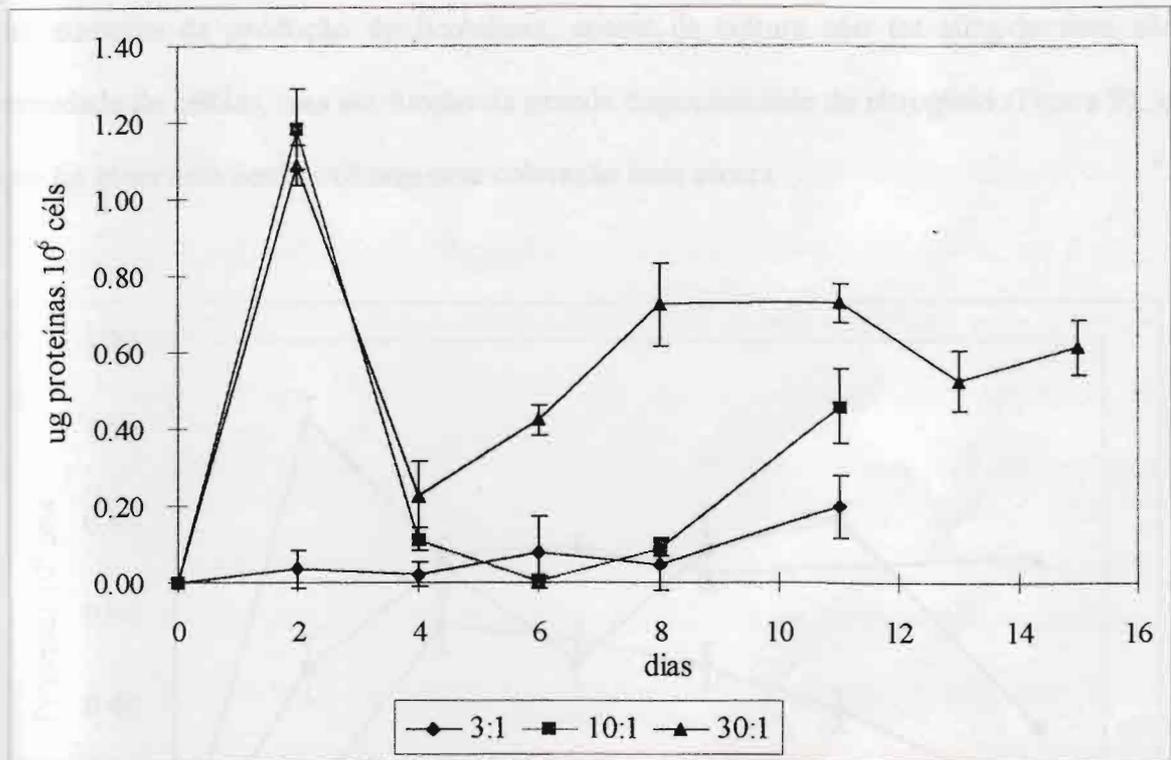


Figura 8: Variação das concentrações de proteínas de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1/10 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

Nas células cultivadas no meio ASM-1 normal, as concentrações de proteínas aumentaram gradativamente, mantendo valores médios bem mais altos que as células em meio ASM-1/10 durante a fase de crescimento exponencial (Figura 9). No entanto, o meio com menor suprimento de nitrogênio (N/P 3:1) apresentou valores médios menores que os meios com N/P 10:1 e 30:1. No final da fase exponencial, houve uma

diminuição na concentração de proteínas nas células cultivadas nas razões N/P 3:1 e 10:1, que foi proporcional à disponibilidade de nitrogênio. No meio com razão N/P 30:1 foram observados elevados valores de proteínas mesmo nos últimos dias do cultivo.

O aumento dos valores de proteínas observados no 8° e 10° dia do cultivo no meio com razão N/P 10:1 podem estar associados à um aumento das ficobilinas, decorrente do processo de autosombreamento. No meio com N/P 30:1 provavelmente também ocorreu um aumento da produção de ficobilinas, apesar da cultura não ter atingido uma alta densidade de células, mas em função da grande disponibilidade de nitrogênio (Figura 9), já que foi observada nestas culturas uma coloração mais escura

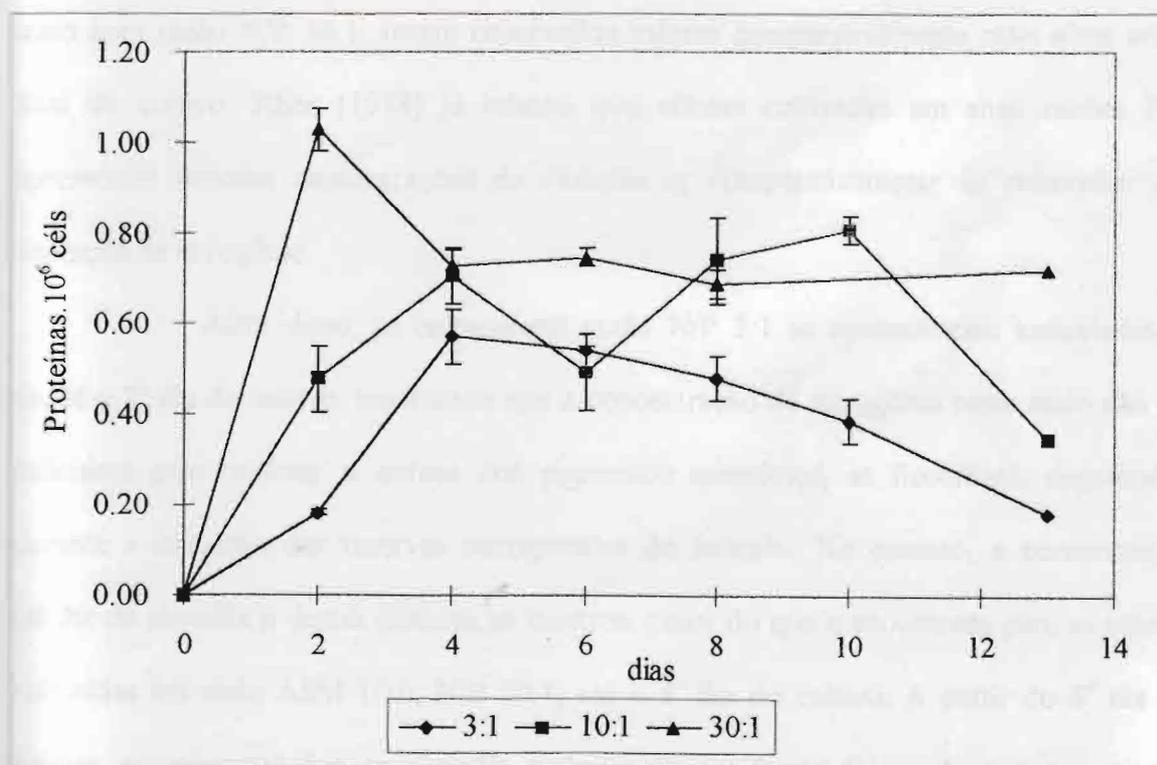


Figura 9: Variação das concentrações de proteínas de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

Resumindo, tanto no meio ASM-1 quanto ASM-1/10, a concentração de proteínas sintetizada pelas células foi uma função da concentração de nitrogênio no meio,

sendo que as células cultivadas em meio ASM-1/10 com razão N/P 3:1 apresentaram valores de proteínas por célula muito baixos, incapazes de permitir um bom crescimento celular.

As Figuras 10 e 11 mostram a variação das concentrações de clorofila *a* durante os cultivos em meio ASM-1/10 e ASM-1. Observa-se um pequeno aumento nas concentrações de clorofila *a* até o 2º dia de cultivo. Este aumento está provavelmente associado ao crescimento celular, devido à presença de nitrogênio no meio, visto a condição de exaustão por este nutriente vivenciada pelas células do inóculo.

Nas células cultivadas em meio ASM-1/10, a concentração de clorofila *a* por célula diminuiu logo após o 2º dia, evidenciando a limitação em nitrogênio, visto que no meio com razão N/P 30:1, foram observados valores comparativamente mais altos até o final do cultivo. Rhee (1978) já relatou que células cultivadas em altas razões N/P apresentam maiores concentrações de clorofila *a*, comparativamente às cultivadas sob limitação de nitrogênio.

Além disso, as culturas em razão N/P 3:1 se apresentaram amareladas já desde o 2º dia de cultivo, mostrando que a concentração de nitrogênio neste meio não foi suficiente para reiniciar a síntese dos pigmentos acessórios, as ficobilinas, degradados durante a exaustão das reservas nitrogenadas do inóculo. No entanto, a concentração celular de clorofila *a* destas culturas se mostrou maior do que a encontrada para as células cultivadas em meio ASM-1/10, N/P 10:1, até o 5º dia do cultivo. A partir do 6º dia de cultivo, as concentrações de clorofila *a* destas duas culturas foi praticamente a mesma (Figura 10), e a cultura com N/P 10:1 também apresentou a coloração amarelada já observada no cultivo em N/P 3:1.

Fogg & Thake (1987) relataram o aumento da relação carotenóides/clorofila *a* em células submetidas à limitação por nitrogênio, devido ao aumento da concentração dos

pigmentos carotenóides. Isto provavelmente aconteceu no meio ASM-1/10, razões N/P 3:1 e 10:1, onde foi verificada uma coloração amarelada nas culturas, não observada nas culturas em N/P 30:1. Além disso, as células na razão N/P 30:1 devem ter produzido uma concentração de ficobilinas maior que as células em N/P 3:1 e 10:1, justificando a grande diferença na coloração destas culturas, visto que este complexo de pigmentos protéicos é o responsável pela cor característica do grupo.

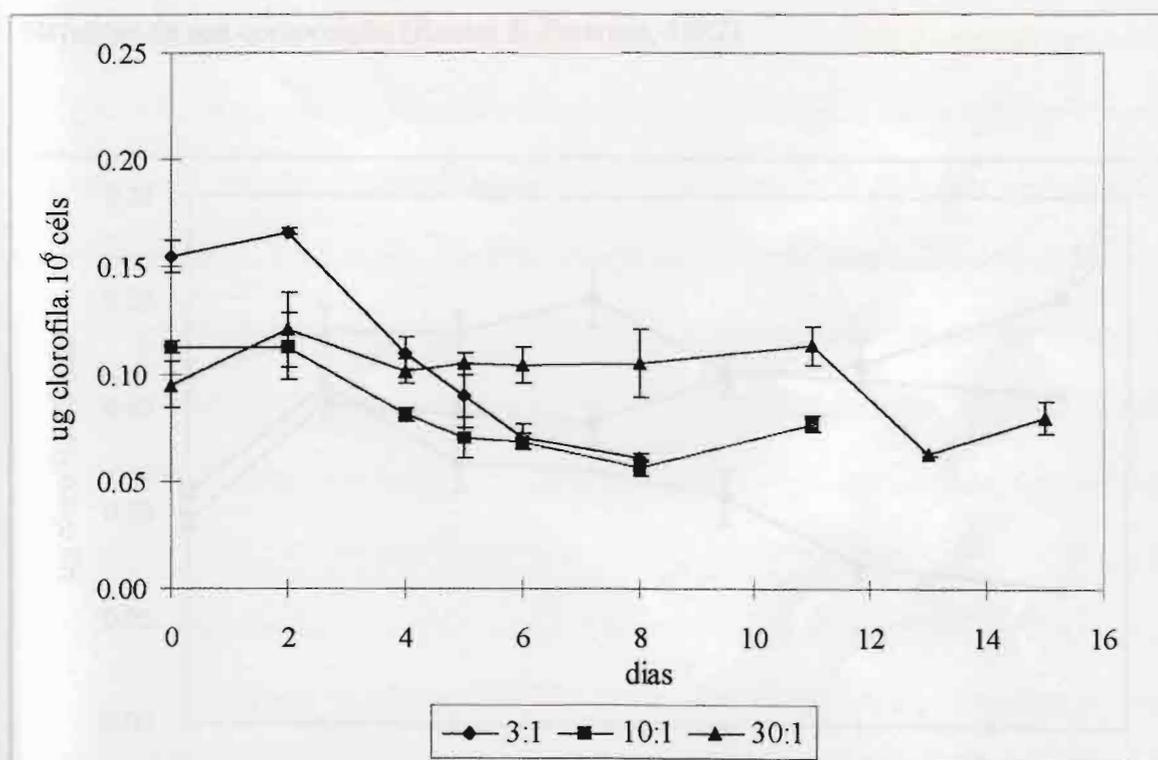


Figura 10: Variação das concentrações de clorofila a de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1/10 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

No meio ASM-1 com razões N/P 10:1 e 30:1, a concentração de clorofila a se manteve alta até o fim do cultivo. No meio ASM-1 com razão N/P 3:1, a concentração intracelular de clorofila a começou a diminuir logo após o 2^o dia do cultivo, devido provavelmente à divisão celular, associada a posterior limitação em nitrogênio do meio que

teria inibido a síntese de novos pigmentos, visto que são compostos ricos em nitrogênio (Figura 11).

As células cultivadas em meio ASM-1 apresentaram valores de clorofila *a* por célula maiores que as células cultivadas em meio ASM-1/10 até os últimos dias de cultivo. Este fato pode ser explicado principalmente pela diferença nas concentrações de nitrogênio do meio, mas também pelas baixas concentrações de alguns micronutrientes envolvidos na síntese de pigmentos, como o ferro, apesar deste micronutriente não participar da sua composição (Rueter & Petersen, 1987).

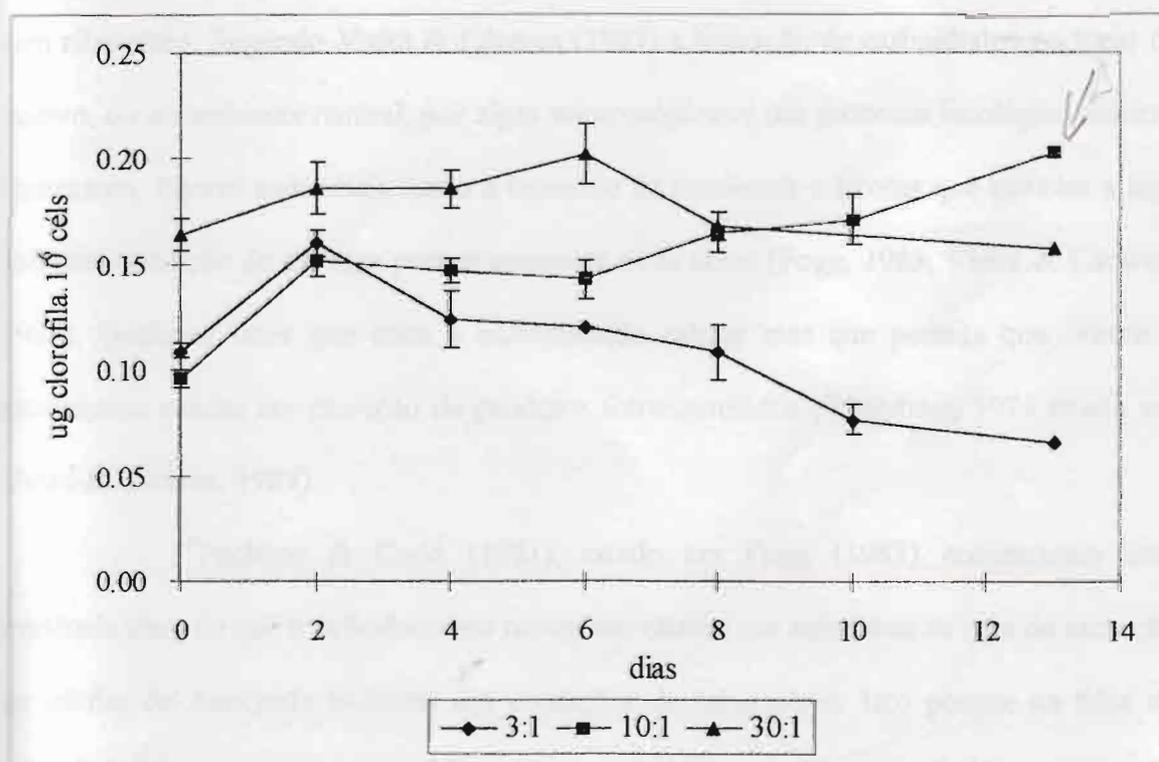


Figura 11: Variação das concentrações de clorofila *a* de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

A diminuição das concentrações de clorofila *a* já foi citada como uma consequência da limitação em nitrogênio (Lapointe & Duke, 1984, Everest *et al.*, 1986,

Duke & Allen, 1990, Foy, 1993), apesar de alguns autores não terem observado variação significativa nas concentrações deste pigmento em células sofrendo limitação de nitrogênio (Van Rijn & Shilo, 1986, Duke & Allen, 1990, Kana *et al.*, 1992).

4.3.3 - Carboidratos Extracelulares

Os maiores valores de carboidratos excretados foram observados no primeiro dia de cultivo, em todas as condições (Figuras 12 e 13). Neste dia, as células provinham de uma condição estressante causada pela permanência durante 6 dias em meio sem nitrogênio. Segundo Vieira & Cáceres (1987) a liberação de carboidratos no meio de cultivo, ou no ambiente natural, por algas microscópicas é um processo fisiológico natural. Entretanto, fatores ambientais como a exaustão de nutrientes e fatores que mantêm a alga sob uma condição de estresse podem aumentar estas taxas (Fogg, 1983, Vieira & Cáceres, 1987). Qualquer fator que iniba a multiplicação celular mas que permita que ocorra a fotossíntese resulta em excreção de produtos fotoassimilados (³Hellebust, 1974 citado em Vieira & Cáceres, 1987).

⁴Pacheco & Codd (1981), citado em Fogg (1983) encontraram uma evidência clara de que a deficiência em nitrogênio causou um aumento na taxa de excreção de células de *Anacystis nidulans* em condições de laboratório. Isto porque na falta de nitrogênio não há síntese de aminoácidos e proteínas, e assim os carboidratos que são produzidos na fotossíntese vão sendo incorporados pela célula em compostos de reserva. A partir de um certo limite, a célula se torna incapaz de incorporar uma quantidade de

³HELLEBUST, J.A. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* v. 10: 192-200, 1965.

⁴PACHECO, F. & CODD, G.A. Formation and fate of glycolic acid in *Chlorella marina*. 1981

carboidratos maior, apesar da sua biosíntese continuar, e assim este “excesso” é excretado (Eberlein & Brockmann, 1986).

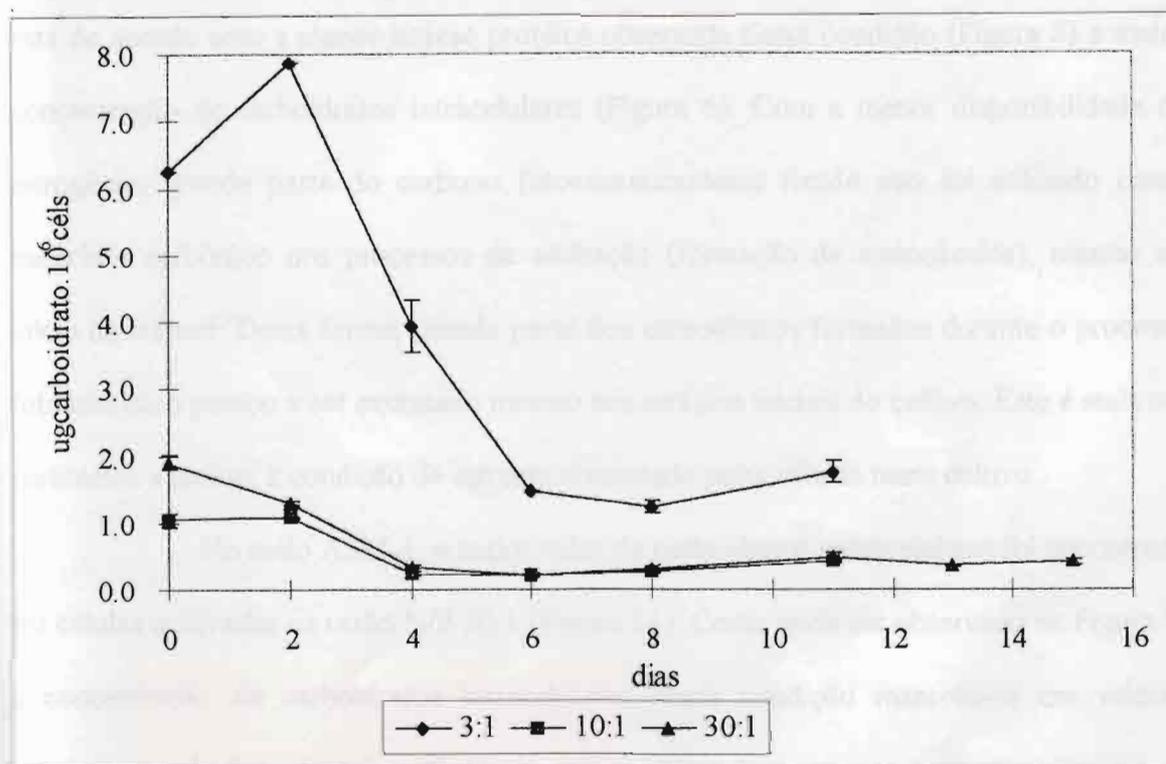


Figura 12: Variação das concentrações de carboidratos extracelulares de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1/10 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

Myklestad & Haug (1972) observaram que a principal produção de polissacarídeos extracelulares por células da diatomácea *Chaetoceros affinis* var. *willei* ocorreu na fase estacionária do crescimento, após o período de rápido aumento de carboidratos intracelulares.

Deste modo, as altas taxas de excreção verificadas no início dos cultivos parecem retratar as altas concentrações celulares destes compostos nas células do inóculo, causadas pela carência em nitrogênio, que inibiu a síntese protéica e o crescimento da população, levando a maiores taxas de excreção dos produtos da fotossíntese. Essas taxas

foram diminuídas ao longo dos cultivos em virtude das menores concentrações intracelulares de carboidratos, causadas pela disponibilidade de nitrogênio.

A maior excreção de carboidratos verificada no meio ASM-1/10, N/P 3:1 está de acordo com a menor síntese protéica observada nessa condição (Figura 8) e maior concentração de carboidratos intracelulares (Figura 6). Com a menor disponibilidade de nitrogênio, grande parte do carbono fotossinteticamente fixado não foi utilizado como esqueleto carbônico nos processos de aminação (formação de aminoácidos), mesmo no início da cultura. Desta forma, grande parte dos carboidratos formados durante o processo fotossintético passou a ser excretado mesmo nos estágios iniciais do cultivo. Este é mais um parâmetro a indicar a condição de estresse vivenciada pelas células neste cultivo.

No meio ASM-1, o maior valor de carboidratos extracelulares foi encontrado em células cultivadas na razão N/P 30:1 (Figura 13). Como pode ser observado na Figura 7, a concentração de carboidratos intracelulares nessa condição manteve-se em valores próximos ao do inóculo até o 4º dia de cultivo. Com isso, mesmo com um aumento da síntese protéica, as células continuaram a apresentar uma concentração elevada de carboidratos, que deve ter induzido um aumento da excreção desses compostos no início do cultivo. Provavelmente o desequilíbrio na razão N/P deve ter influenciado processos metabólicos que favoreçam a liberação de carboidratos para o meio, o que também evidencia uma condição estressante.

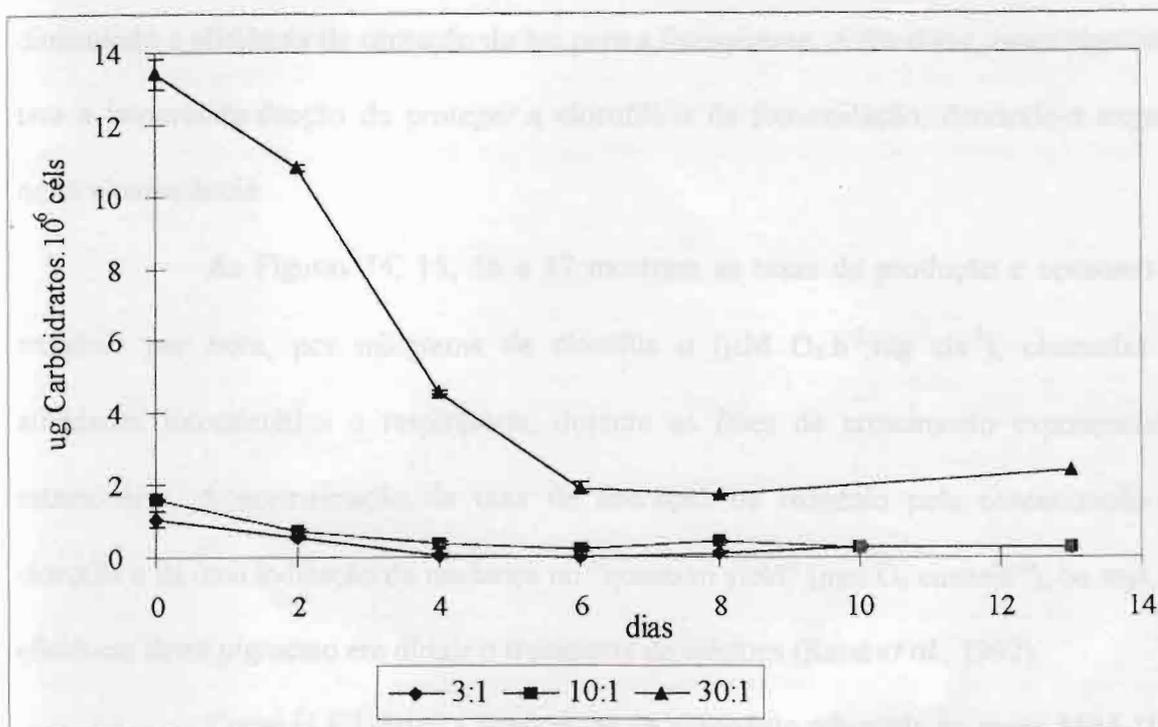


Figura 13: Variação das concentrações de carboidratos extracelulares de *S. aquatilis* f. *salina* no meio ASM-1 com razões N/P 3:1, 10:1 e 30:1. A barra indica o desvio padrão ao redor da média de três culturas.

4.3.4 - Atividades Fotossintética e Respiratória

Pouca ênfase tem sido dada ao efeito da falta de nitrogênio sobre a fotossíntese (Allen *et al.*, 1990, Kana *et al.*, 1992), apesar da degradação das ficobiliproteínas (ficocianinas, ficoeritrinas e aloficocianinas), em células submetidas à limitação em nitrogênio, ter sido amplamente relatada (Allen & Hutchison, 1980, Syrett, 1981, Weisshaar & Boger, 1983, Van Rijn & Shilo, 1986, Bryant, 1987, Fogg & Thake, 1987, Allen *et al.*, 1990, Duke & Allen, 1990, Turpin, 1991, Kana *et al.*, 1992, Foy, 1993). Esse fenômeno é chamado de clorose e segundo Kana *et al.* (1992), ocorre rapidamente, sendo que 80 a 95% das ficobiliproteínas são degradadas durante as primeiras 24 horas em ausência de nitrogênio. Esta degradação diminui o tamanho do complexo antena,

diminuindo a eficiência de captação de luz para a fotossíntese. Além disso, esses pigmentos tem a importante função de proteger a clorofila α da fotooxidação, deixando-a exposta nesta circunstância.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 mostram as taxas de produção e consumo de oxigênio por hora, por miligrama de clorofila α ($\mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl a}^{-1}$), chamadas de atividades fotossintética e respiratória, durante as fases de crescimento exponencial e estacionário. A normalização da taxa de liberação de oxigênio pela concentração de clorofila α dá uma indicação da mudança no “quantum yield” ($\text{mol O}_2 \cdot \text{einstein}^{-1}$), ou seja, da eficiência deste pigmento em dirigir o transporte de elétrons (Kana *et al.*, 1992).

Como já foi visto, a quantidade de nitrogênio oferecida no meio ASM-1/10, N/P 3:1 não foi suficiente para que as células do inóculo, exauridas deste nutriente, se recuperassem e desenvolvessem um bom crescimento. Desse modo, essas células já apresentavam sinais de limitação por nitrogênio logo no início do cultivo.

As células cultivadas em meio ASM-1/10, N/P 10:1, parecem ter tido no início do cultivo, uma concentração de nitrogênio suficiente para sustentar uma considerável síntese de proteínas, que permitiu o crescimento da população. No entanto, após a segunda divisão celular, aproximadamente no 5º dia de cultivo, estas células também mostraram-se limitadas pelo nitrogênio. Já as células cultivadas no meio ASM-1/10, N/P 30:1, parecem ter sido as únicas cultivadas em meio ASM-1/10 que não sofreram limitação por nitrogênio.

Pode-se observar os baixos valores da atividade fotossintética das células em meio ASM-1/10, quando comparados aos mesmos valores de células mantidas no meio ASM-1 (Tabelas 10 e 11 e Figuras 14 e 15).

Tabela 10: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1/10. Os termos manhã, meio e tarde correspondem as incubações realizadas nos seguintes horários: 6:45-8:45h, 11:30-13:30h e 16:45-18:45h, respectivamente. Os números sobrescritos correspondem ao desvio padrão em torno da média.

Fase Exponencial								
	Fotossíntese				Respiração			
N/P	Manhã	Meio	Tarde	Média	Manhã	Meio	Tarde	Média
3:1	77.2 ^{7.2}	69.3 ^{19.6}	66.4 ^{7.8}	70.97	-81.6 ^{15.5}	-82.0 ^{6.9}	-64.4 ^{22.4}	-76.02
10:1	15.5 ^ˆ	82.0 ^{10.8}	46.1 ^{1.8}	47.85	-95.8 ^{5.9}	-30.0 ^{1.4}	-57.3 ^{1.7}	-61.05
30:1	99.5 ^{57.2}	112.0 ^{16.2}	235.0 ^{16.0}	105.75	-92.4 ^{18.5}	-73.0 ^{7.7}	-	-82.73
Fase Estacionária								
	Fotossíntese				Respiração			
N/P	Manhã	Meio	Tarde	Média	Manhã	Meio	Tarde	Média
3:1	-96.5 ^{36.9}	-20.7 ^{20.4}	22.9 ^{27.2}	-31.45	-135.4 ^{41.6}	-49.0 ^{3.7}	-	-92.23
10:1	4.3 ^ˆ	10.2 ^{2.7}	8.3 ^{1.5}	7.60	-81.3 ^{15.5}	-74.3 ^{25.9}	-72.4 ^{16.0}	-76.01
30:1	-49.7 ^{2.1}	-53.5 ^{5.3}	-29.5 ^{4.3}	-44.23	-54.1 ^{5.8}	-50.9 ^{4.6}	-40.8 ^{3.5}	-48.61

Muitos fatores podem ser citados para explicar a menor atividade fotossintética em células submetidas a limitação por nitrogênio. A diminuição das enzimas do metabolismo fotossintético do carbono já foi relatada (Allen *et al.*, 1990, Duke & Allen, 1990), sendo que Duke & Allen (1990) sugerem que a Rubisco presente nos carboxissomas pode servir como uma reserva de nitrogênio. Stevens *et al.* (1981), ressaltam que pode haver até mesmo o desaparecimento da membrana do tilacóide em células de *Synechococcus* sp. severamente limitadas por nitrogênio.

Turpin (1991) relata que em condições de “steady-state” o grau de limitação em nitrogênio define a taxa fotossintética líquida. Além disso, algas limitadas em nitrogênio apresentam uma maior susceptibilidade à fotoinibição.

Tabela 11: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1. Os termos manhã, meio e tarde correspondem as incubações realizadas nos seguintes horários: 6:45-8:45h, 11:30-13:30h e 16:45-18:45h, respectivamente. Os números sobrescritos correspondem ao desvio padrão em torno da média.

Fase Exponencial								
	Fotossíntese				Respiração			
N/P	Manhã	Meio	Tarde	Média	Manhã	Meio	Tarde	Média
3:1	145.6 ^{26.8}	133.2 ^{23.8}	105.4 ^{16.7}	128.09	-15.4 ^{2.5}	-15.8 ^{2.0}	-19.7 ^{1.2}	-16.98
10:1	91.8 ^{1.4}	70.0 ^{6.3}	88.9 ^{1.3}	83.55	-5.4 ^{1.4}	-14.2 ^{1.1}	-8.7 ^{1.2}	-9.44
30:1	113.6 ^{17.9}	110.3 ^{15.3}	95.4 ^{8.6}	106.43	-17.9 ^{2.1}	-19.7 ^{2.1}	-15.6 ^{2.3}	-17.70
Fase Estacionária								
	Fotossíntese				Respiração			
N/P	Manhã	Meio	Tarde	Média	Manhã	Meio	Tarde	Média
3:1	40.5 ^{8.4}	49.1 ^{2.2}	39.5 ^{4.1}	43.03	-26.1 ^{6.1}	-15.1 ^{4.0}	-27.1 ^{4.3}	-22.75
10:1	50.7 ^{4.3}	45.1 ^{2.5}	42.0 ^{0.9}	45.94	-4.6 ^{0.1}	-6.6 ^{0.6}	-6.6 ^{1.0}	-5.93
30:1	15.6 ^{13.2}	17.9 ^{6.6}	15.3 ^{12.2}	16.27	-12.2 ^{6.7}	-31.8 ^{2.8}	-20.6 ^{6.2}	-21.53

De maneira simples, pode-se prever uma diminuição da atividade fotossintética em condição de limitação em nitrogênio, já que a demanda pelos produtos da fotossíntese diminui durante a falta de um nutriente fundamental.

Desse modo pode-se explicar a diferença encontrada entre a atividade fotossintética de células submetidas à limitação em nitrogênio e baixas concentrações dos demais elementos envolvidos neste processo, como as cultivadas em meio ASM-1/10 (Tabela 10 e Figura 14), e as de células cultivadas em meio ASM-1 (Tabela 11 e Figura 15), durante a fase de crescimento exponencial. Nas células cultivadas em meio ASM-1/10, N/P 30:1 e ASM-1, N/P 30:1, foi observada praticamente a mesma atividade fotossintética durante a fase exponencial. Nesta fase do crescimento, as células no meio ASM-1/10, N/P 30:1 apresentaram a maior atividade fotossintética, entre as células cultivadas em ASM-

1/10. Este dado mostra o importante papel desempenhado pela disponibilidade de nitrogênio sobre a atividade fotossintética. Isto porque um suprimento maior deste nutriente foi capaz de sustentar uma maior taxa fotossintética, mesmo em meio ASM-1 diluído 10 vezes (ASM-1/10), onde a limitação por outros íons também deve estar acontecendo.

A queda na atividade fotossintética durante a falta de nitrogênio, já foi observada por Lapointe & Duke (1984), Kana *et al.* (1992) e Allen *et al.* (1990) para células de *Synechocystis*. Segundo Allen *et al.* (1990) o fotosistema II pode se tornar inativo, conforme o encontrado por Kana *et al.* (1992), causando a inibição da liberação de oxigênio induzida pela luz. É interessante dizer que a inativação do fotosistema II é reversível, sendo recuperado rapidamente após a adição de nitrato ao meio, ocorrendo antes de haver um aumento significativo nos níveis de ficocianina (Allen *et al.*, 1990).

Segundo Fogg & Thake (1987), células submetidas à limitação prolongada por nitrogênio apresentam taxas fotossintéticas máximas diminuídas, tornando-se somente 5% da taxa inicial. A fotossíntese nestas células resulta na expansão celular e no aumento do peso seco celular, porém não mais em crescimento da população.

Além do nitrogênio, outros íons também se encontravam em concentrações muito baixas no meio ASM-1/10 (ver Tabela 1) e suas influências sobre a atividade fotossintética devem ser consideradas. Na fotossíntese, o ferro é necessário para a síntese de compostos da cadeia transportadora de elétrons como os citocromos, a ferredoxina e as proteínas Fe-S, para a biosíntese de pigmentos e para a organização do aparelho fotossintético (Rueter & Petersen, 1987). Além disso, a redução do nitrogênio também requer ferro. Desta maneira pode-se prever uma diminuição severa na fotossíntese líquida, tanto em termos da quantidade total de carbono fixado, quanto em termos de poder redutor disponível, em condição de limitação por ferro (Rueter & Petersen, 1987).

O requerimento de manganês na etapa onde há liberação de oxigênio durante a fotossíntese é bem conhecido, apesar de ainda não se saber ao certo o papel deste elemento. Sabe-se somente que ele está associado ao fotosistema II das cianobactérias (Bryant, 1987). Dois outros cofatores inorgânicos, os íons cloro e cálcio também desempenham papéis importantes no processo de liberação de oxigênio. A deficiência em enxofre causa mudanças que são similares às aquelas causadas pela falta de nitrogênio.

Desse modo, baixas concentrações desses micronutrientes, como as encontradas no meio ASM-1/10, podem levar à um grande declínio da capacidade fotossintética celular.

Durante a fase exponencial, foi observada uma grande diferença entre a atividade respiratória das células cultivadas em meio ASM-1 e ASM-1/10 (Tabelas 10 e 11 e Figuras 14 e 15). As células mantidas em meio ASM-1/10 apresentaram uma atividade respiratória muito maior do que as células em meio ASM-1. Não foi observada diferença entre a atividade respiratória das células mantidas nas diferentes razões N/P no meio ASM-1/10. No meio ASM-1, as células em N/P 10:1 apresentaram o menor valor deste parâmetro. Esta taxa respiratória maior no meio ASM-1/10 pode estar associada a degradação das reservas celulares numa tentativa de obter energia, já que o processo fotossintético se encontrava prejudicado devido às baixas concentrações de nitrogênio e outros nutrientes.

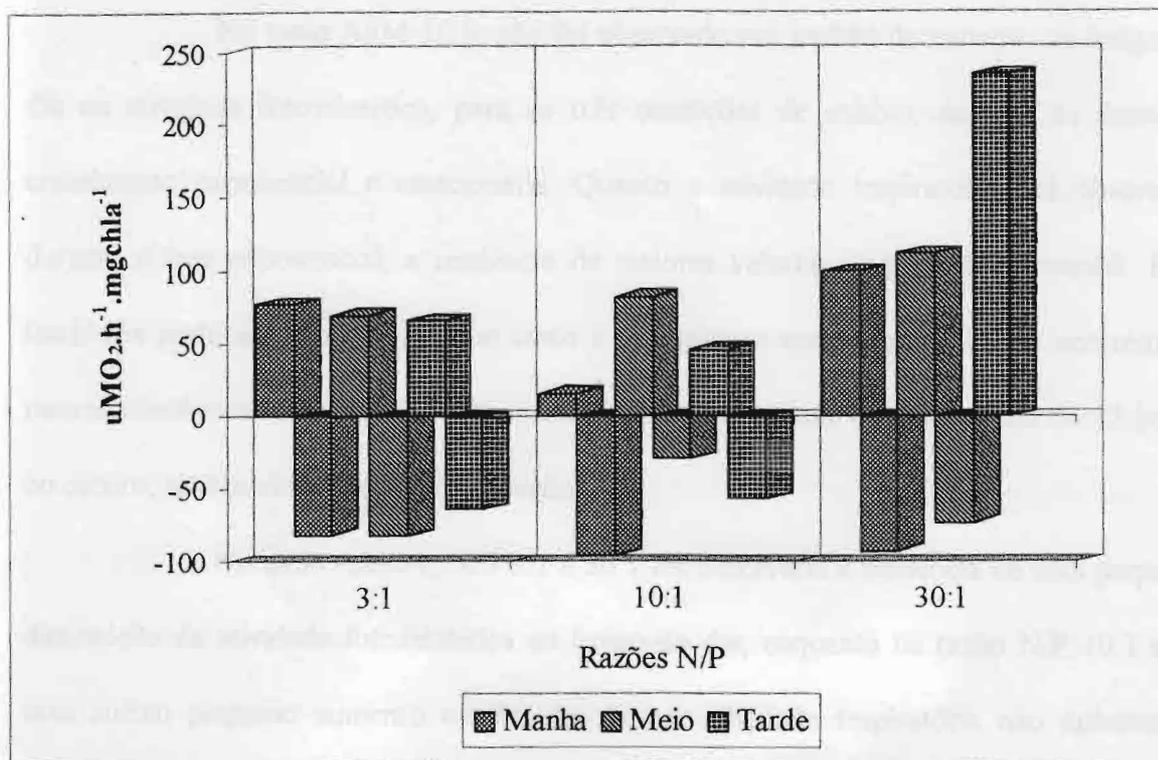


Figura 14: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1/10 na fase de crescimento exponencial.

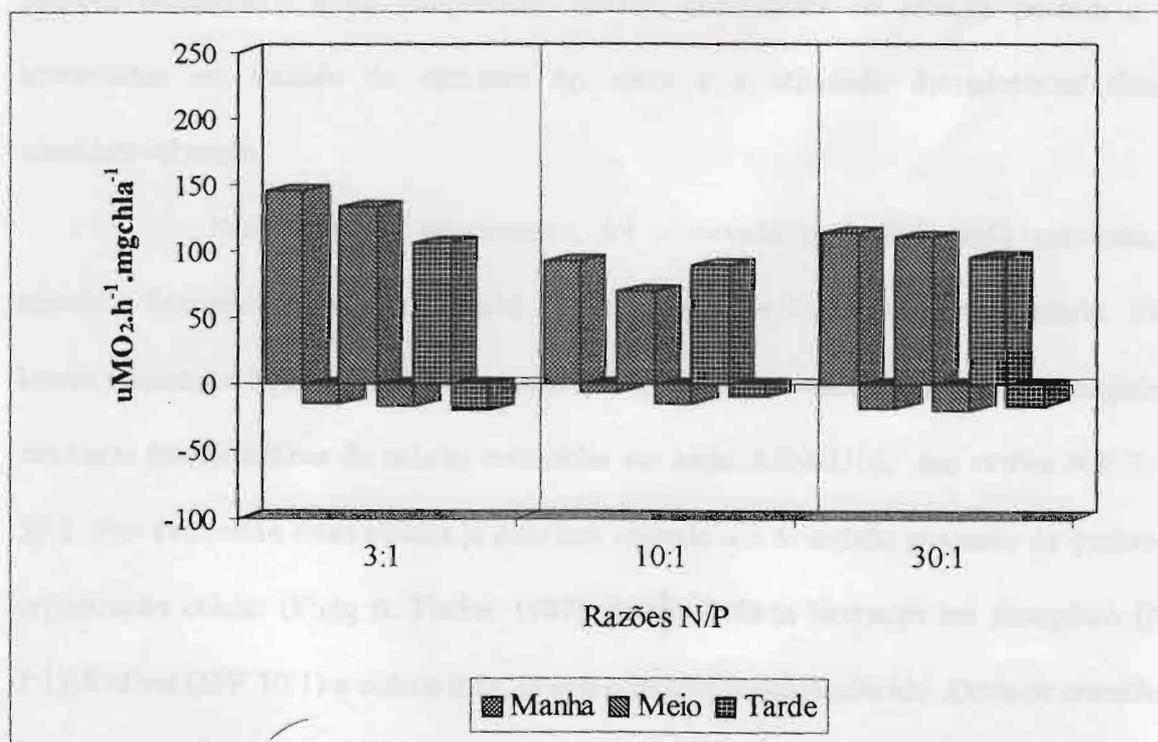


Figura 15: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis* f. *salina* cultivada em meio ASM-1 na fase de crescimento exponencial.

No meio ASM-1/10, não foi observado um padrão de variação ao longo do dia na atividade fotossintética, para as três condições de cultivo, durante as fases de crescimento exponencial e estacionária. Quanto a atividade respiratória, foi observada durante a fase exponencial, a tendência de maiores valores no período da manhã. Esta tendência pode ser explicada já que tanto a fotossíntese quanto a respiração ocorrem na mesma membrana nas cianobactérias, e estas células provinham de um período de 12 horas no escuro, realizando somente a respiração.

No meio ASM-1, N/P 3:1 e 30:1 foi observada a tendência de uma pequena diminuição da atividade fotossintética ao longo do dia, enquanto na razão N/P 10:1 esta taxa sofreu pequeno aumento no fim do dia. A atividade respiratória não apresentou variação marcante ao longo do dia.

Durante a fase de crescimento estacionário ocorrem grandes mudanças nos padrões metabólicos e na composição celular, substâncias de reserva passam a ser acumuladas em virtude da escassez do meio e a atividade fotossintética diminui consideravelmente.

Nesta fase do crescimento, foi observada uma diminuição marcante da atividade fotossintética no meio ASM-1/10 (Figura 16 e Tabela 10). Na verdade, como houve respiração líquida mesmo em presença de luz, foram encontrados valores negativos nas taxas fotossintéticas de células cultivadas em meio ASM-1/10, nas razões N/P 3:1 e 30:1. Provavelmente estas células já estariam vivendo um avançado processo de quebra da organização celular (Fogg & Thake, 1987), devido à forte limitação em nitrogênio (N/P 3:1), fósforo (N/P 30:1) e outros íons, já que o meio é bastante diluído. Deve-se considerar também a inativação do fotosistema II sugerida por Allen *et al.* (1990). No meio ASM-1/10, N/P 10:1 foi constatada uma baixa atividade fotossintética.

Foi observado um pequeno aumento da atividade respiratória das células em meio ASM-1/10, N/P 3:1 e 10:1 durante a fase estacionária (Figura 16 e Tabela 10). Como foi observada a perda da capacidade fotossintética nos cultivos em meio ASM-1/10, N/P 3:1, é possível que este aumento na atividade respiratória esteja relacionado à degradação dos compostos de reserva celulares, numa tentativa de obter energia para processos como por exemplo a redução do nitrato. Segundo Guerrero & Lara (1987) a redução do nitrato em cianobactérias é um processo genuinamente fotossintético, já que usa diretamente o poder redutor gerado pela fotossíntese. No entanto, estes autores observaram que em células de espécies de cianobactérias extremamente limitadas pelo nitrogênio, a redução do nitrato pode ocorrer pela fotossíntese anoxigênica, através do uso do carboidrato acumulado.

Quanto às células cultivadas no meio ASM-1, também foi observada uma queda da atividade fotossintética durante a fase estacionária de crescimento (Tabela 11 e Figura 17). Esta queda é uma decorrência da fase estacionária ser um período de menor atividade fotossintética, se comparada com a fase de crescimento exponencial. Isto porque as células apresentam um metabolismo mais lento, voltado para o acúmulo de compostos de reserva, enquanto a síntese de proteínas e o crescimento da população é diminuído, devido a escassez do meio de cultura. Foi observada uma diminuição da atividade fotossintética mais pronunciada no meio com razão N/P 30:1, que pode ser atribuída a um suprimento desequilibrado de nitrogênio em relação ao fósforo. Stevens *et al.* (1981) observou reduções severas nas concentrações de ficobiliproteínas e clorofila das células de *Synechococcus* sp. sob condição de limitação por fosfato. Além disso, o conteúdo celular de nitrogênio também diminui e há uma redução substancial dos tilacóides. Esta queda mais pronunciada na atividade fotossintética em células cultivadas no meio ASM-1,

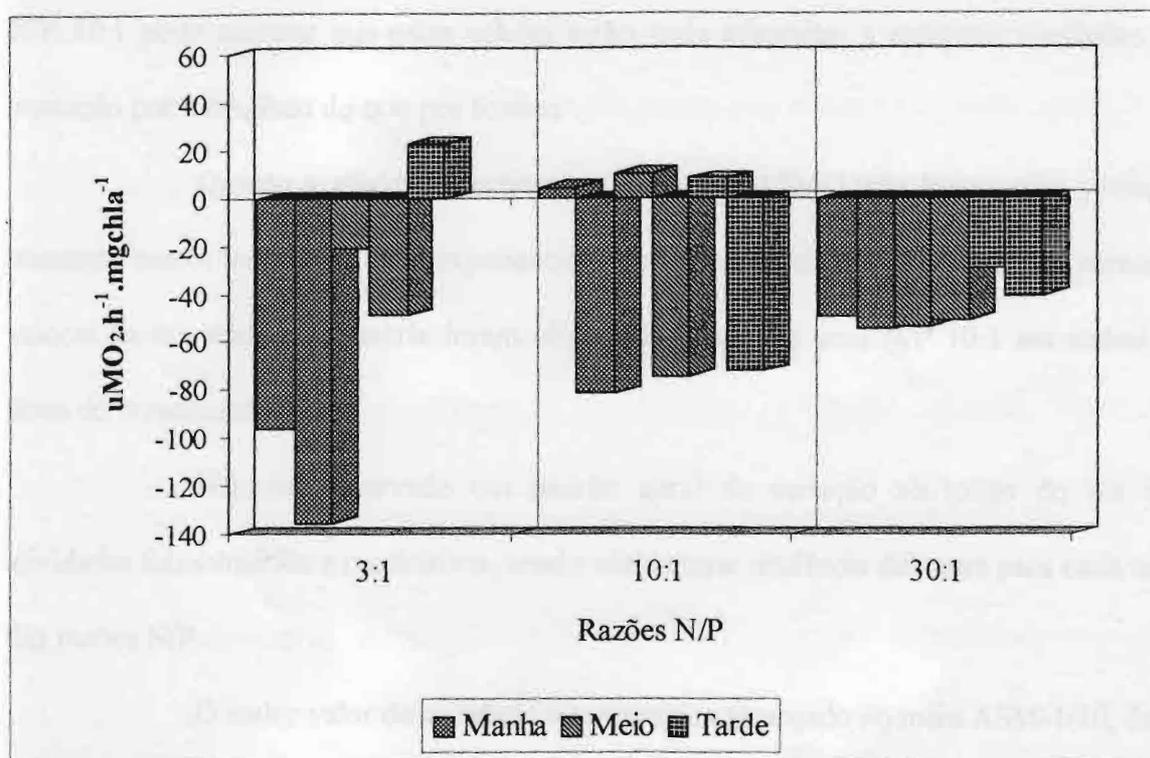


Figura 16: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis f. salina* cultivada em meio ASM-1/10 na fase de crescimento estacionário.

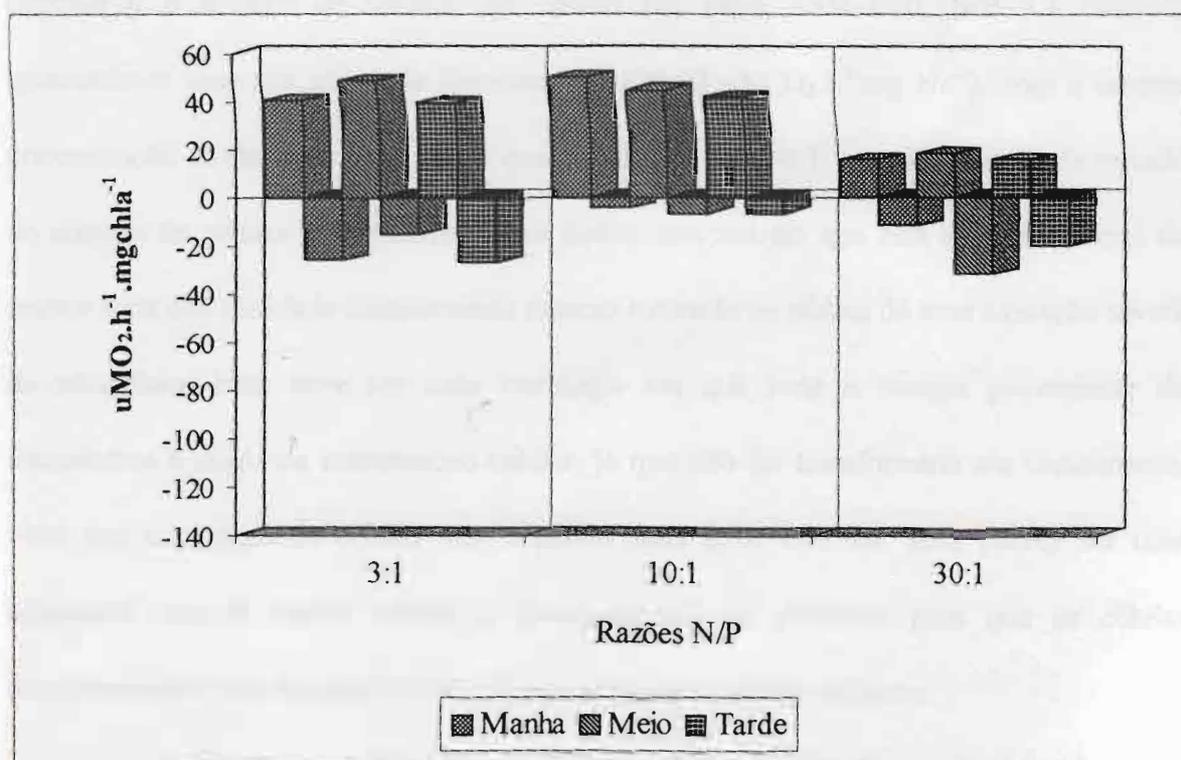


Figura 17: Atividades fotossintética e respiratória em $\mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$ de *S. aquatilis f. salina* cultivada em meio ASM-1 na fase de crescimento estacionário.

N/P 30:1 pode mostrar que estas células estão mais adaptadas a enfrentar condições de limitação por nitrogênio do que por fosfato.

Quanto a atividade respiratória, no meio ASM-1 não houve uma variação marcante nestes valores da fase exponencial para a estacionária. No entanto, os menores valores da atividade respiratória foram observados no meio com N/P 10:1 em ambas as fases do crescimento.

Não foi observado um padrão geral de variação ao longo do dia das atividades fotossintética e respiratória, sendo obtida uma tendência diferente para cada uma das razões N/P.

O maior valor de atividade fotossintética alcançado no meio ASM-1/10, foi o das células em meio ASM-1/10, N/P 30:1 ($105,75 \mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$), durante a fase exponencial. Na Tabela 12 pode-se ver que este dado coincide com altos valores de clorofila *a* e número de células. As células em meio ASM-1/10, N/P 3:1 também apresentaram uma alta atividade fotossintética ($70,97 \mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg cl}^{-1}$), com a mesma concentração de clorofila *a* por célula que a condição N/P 30:1, mas com menos de metade do número de células por mililitro. Esses dados demonstram que esta espécie é capaz de manter uma alta atividade fotossintética mesmo sofrendo os efeitos de uma limitação severa de nitrogênio. Esta deve ser uma estratégia em que toda a energia proveniente da fotossíntese é usada na manutenção celular, já que não foi transformada em crescimento, visto que o número de células não duplicou mais após este dia. Esta parece ser uma adaptação notável destas células, e deve ser útil no ambiente para que as células mantenham-se vivas durante as fases de limitação severa deste nutriente.

No meio ASM-1 outro dado interessante foi observado; a maior taxa fotossintética encontrada durante a fase exponencial foi a das células cultivadas em N/P 3:1,

e não na N/P 10:1, que é a razão N/P própria do meio ASM-1. Isto demonstra mais uma vez a capacidade desta espécie em superar a limitação por nitrogênio e desenvolver taxas fotossintéticas relativamente altas, quando as concentrações dos demais nutrientes se encontram na faixa considerada ótima.

A menor atividade fotossintética obtida foi justamente nas células mantidas na razão N/P 10:1 (meio ASM-1). Apesar disso, as células mantidas nesta N/P apresentaram sempre altas taxas de crescimento durante um tempo maior, elevados valores de proteínas intracelulares e um rendimento máximo bastante superior ao das outras culturas. Desse modo, as células cultivadas na N/P 10:1, parecem ter usado mais energia na reprodução, apresentando uma melhor eficiência de utilização da energia proveniente da fotossíntese, dedicando mais energia ao processo de reprodução.

As células na razão N/P 30:1 (meio ASM-1) apresentaram durante a fase exponencial um alta atividade fotossintética, que sofreu uma queda acentuada na fase estacionária. Nesta fase do crescimento a atividade fotossintética foi 10 vezes menor que a taxa medida durante a fase exponencial. Nos meios com razões N/P 3:1 e 10:1 a diminuição da taxa fotossintética durante a fase estacionária foi bem menor, sendo 3 e 2 vezes menor, respectivamente. Além disso, as células cultivadas na razão N/P 30:1 duplicaram seu número de células somente três vezes durante todo o cultivo. Isto mostra que o meio com razão N/P 30:1 não ofereceu boas condições para o desenvolvimento desta espécie, corroborando a hipótese de que esta espécie está melhor adaptada a uma condição de baixa razão N/P. No meio com razão N/P 3:1, a queda na atividade fotossintética foi bem menor e o número de células atingido pela cultura foi maior que em N/P 30:1 (Tabelas 11 e 12).

Tabela 12: Dados do dia em que foi feito o experimento de avaliação das atividades fotossintética e respiratória. Dia do cultivo em que foi feito o experimento na fase exponencial e estacionária, clorofila a expressa em $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$ céls.

	ASM-1/10			ASM-1		
	3:1	10:1	30:1	3:1	10:1	30:1
F. Exponencial	5° dia	5° dia	4° dia	6° dia	8° dia	6° dia
Clorofila a	0,09	0,07	0,10	0,12	0,16	0,20
No de céls. ml^{-1}	2396500	6135000	5625833	11297222	18641111	7612500
F. Estacionária	11° dia	8° dia	15° dia	13° dia	17° dia	13o dia
Clorofila a	0,06	0,06	0,08	0,07	0,19	0,16
No de céls. ml^{-1}	3386875	8013333	9806667	29705000	42161667	11912500

4.3.5 - pH

A análise da variação dos valores de pH das culturas corrobora os resultados encontrados na análise do oxigênio. O pH aumenta no meio como resultado da assimilação fotossintética do CO_2 , enquanto processos de decomposição e respiração causam uma diminuição do pH do meio, decorrente da liberação de CO_2 .

No meio ASM-1/10 (Tabela 13), o aumento do pH durante a fase exponencial foi proporcional à concentração de nitrogênio no meio. As maiores variações deste parâmetro foram observadas no meio com N/P 30:1, onde o valor máximo de pH chegou a 9,411, em seguida N/P 10:1, com valor máximo de pH igual a 9,043 e N/P 3:1, com valor máximo de 7,366. Estes valores máximos indicam a magnitude da assimilação do CO_2 em cada um dos diferentes cultivos.

Na fase estacionária, as variações do pH no meio ASM-1/10, em presença de luz, tornaram-se bem mais estreitas, tendo sido observadas variações até mesmo negativas

(diminuição do pH), como o observado na análise do oxigênio. A condição N/P 10:1 foi a única onde as variações foram sempre positivas, apesar de pequenas, também como o observado com o oxigênio.

No meio ASM-1 (Tabela 14), foram observadas variações de pH bem mais marcantes, principalmente no meio com razão N/P 30:1. Os maiores valores de pH encontrados em cada cultivo foram 9,981, 10,112 e 10,007 para os meios com N/P 3:1, 10:1 e 30:1, respectivamente. Foi observada a tendência de aumento dos valores de pH ao longo do dia. Quanto as amostras que permaneceram no escuro, foi observada uma pequena diminuição no valor do pH do meio, associada a respiração.

Durante a fase estacionária, foi observada uma menor variação do pH das amostras incubadas em presença de luz nos meio com N/P 3:1 e 30:1. No entanto, no meio com razão N/P 10:1 houve um aumento do pH do meio maior que o observado durante a fase exponencial. Este dado indica que houve um aumento da assimilação do CO_2 do meio nesta fase do crescimento, o que não foi confirmado na análise da variação do oxigênio. O meio com N/P 30:1 apresentou os menores valores de pH, assim como os menores valores de atividade fotossintética. Quanto as amostras que permaneceram no escuro, foi observada novamente uma pequena diminuição no valor do pH do meio, não havendo diferença dos valores encontrados durante a fase exponencial.

Tabela 13: Variação dos valores de pH de amostras de cultivos em meio ASM-1/10 com razões N/P 3:1, 10:1 ou 30:1, durante incubações em frascos claros e escuros de 2 horas de duração realizadas 3 vezes no dia, nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Médias calculadas a partir de réplicas de cada condição de cultivo, valores sobrescritos representando o desvio padrão correspondente a cada média.

		ASM-1/10					
		3:1		10:1		30:1	
Fase Exponencial	pH inicial	pH final claro	pH inicial	pH final claro	pH inicial	pH final claro	
1ª incubação	6.800 0.125	7.366 0.056	6.886 0.073	8.706 0.424	7.183 0.304	9.078 0.762	
2ª incubação	5.986 0.050	6.962 0.124	6.897 0.043	8.893 0.141	7.655 0.736	9.411 0.188	
3ª incubação	6.474 0.302	6.537 0.127	7.886 0.727	9.043 0.290	7.074 0.088	9.142 0.445	
Fase Estacionária							
1ª incubação	6.709 0.008	6.359 0.073	6.959 0.112	7.636 0.421	7.213 0.060	7.317 0.149	
2ª incubação	6.283 0.016	6.206 0.035	6.701 0.076	7.082 0.252	7.336 0.118	7.217 0.034	
3ª incubação	6.446 0.174	6.185 0.101	6.806 0.056	7.391 0.592	7.188 0.058	7.084 0.012	

Tabela 14: Variação dos valores de pH de amostras de cultivos em meio ASM-1 com razões N/P 3:1, 10:1 ou 30:1, durante incubações em frascos claros e escuros de 2 horas de duração realizadas 3 vezes no dia, nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Médias calculadas a partir de triplicatas de cada condição de cultivo, valores sobrescritos representando o desvio padrão correspondente a cada média.

		ASM-1						
		3:1		10:1		30:1		
Fase Exponencial	pH inicial	pH final claro	pH final escuro	pH inicial	pH final claro	pH inicial	pH final claro	pH final escuro
1ª incubação	7.837 0.541	9.798 0.168	7.441 0.106	7.584 0.077	9.887 0.094	7.669 0.129	9.827 0.260	7.252 0.049
2ª incubação	8.628 0.529	9.968 0.272	7.777 0.508	8.430 0.139	9.906 0.140	7.943 0.231	9.930 0.223	7.469 0.276
3ª incubação	8.931 0.589	9.981 0.087	8.053 0.401	8.881 0.068	10.112 0.198	8.372 0.753	10.007 0.331	8.119 0.755
Fase Estacionária								
1ª incubação	7.844 0.053	8.567 0.127	7.032 0.199	8.867 0.398	10.153 0.091	7.728 0.100	8.332 0.616	7.139 0.101
2ª incubação	8.521 0.439	9.533 0.372	7.999 0.418	9.001 0.163	10.494 0.035	7.617 0.228	8.233 0.757	7.244 0.081
3ª incubação	8.076 0.578	9.396 0.377	7.996 0.481	9.231 0.445	10.335 0.127	7.428 0.079	7.716 0.634	7.091 0.034

4.3.6 - Tamanho Celular

A Tabela 15 mostra os valores do diâmetro, área da superfície, volume e relação superfície/volume das células cultivadas nas diferentes condições. O resultado do teste de Duncan mostrou que houve uma diferença significativa, ao nível de significância de $p < 0.05$, entre o diâmetro, a área da superfície, o volume celular e a relação superfície/volume das células cultivadas em meio ASM-1, N/P 30:1 e as células cultivadas nas demais condições.

Segundo Fogg & Thake (1987), células deficientes em nitrogênio tendem a ser maiores que células que não estejam sofrendo esta limitação. No entanto, neste trabalho foi observada a tendência oposta. As células cultivadas sobre a menor razão N/P foram menores que as células cultivadas em maior razão N/P, que provavelmente vivenciavam a limitação por fósforo. Uma explicação para este fato pode ser a de que o tempo de duração da fase de crescimento exponencial das células cultivadas em meio ASM-1, N/P 30:1 foi o menor, dentre as células cultivadas em meio ASM-1, iniciando logo a fase estacionária, apesar das altas concentrações de clorofila, proteínas e carboidratos intracelulares até os últimos dias do cultivo. Desse modo, essas células não se dividiram, apesar de apresentarem uma rica composição intracelular, o que levou então ao maior diâmetro, superfície e volume celular.

A relação superfície/volume é um dado importante em estudos de fisiologia, e pode ser relacionada à taxa de crescimento (Foy, 1980). Células que apresentam uma menor relação superfície/volume, apresentam uma maior superfície relativa, para absorção de luz e nutrientes e para liberação de produtos do metabolismo (Lewis, 1976). Neste trabalho também foi verificada uma diferença significativa entre a relação superfície/volume das células cultivadas em meio ASM-1, razão N/P 30:1 e às demais células.

Tabela 15: Diâmetro, área da superfície, volume e relação superfície/volume de células de *S. aquatilis* f. *salina* cultivadas em meio ASM-1/10 ou ASM-1 com razões N/P de 3:1 ou 10:1 ou 30:1. Medições realizadas no último dia de cultivo. Valores médios, calculados a partir da medição de 50 células de cada condição, valores sobrescritos representam o desvio padrão correspondente a cada média. Valores expressos em micrômetros (μm).

N/P	ASM-1/10			ASM-1		
	3:1	10:1	30:1	3:1	10:1	30:1
Diâmetro	3.18 ^{0.2}	3.20 ^{0.2}	3.18 ^{0.2}	3.22 ^{0.2}	3.19 ^{0.1}	3.37 ^{0.2}
Superfície	31.78 ^{3.4}	32.37 ^{4.2}	31.95 ^{3.6}	32.59 ^{3.6}	32.10 ^{2.8}	35.90 ^{4.7}
Volume	16.92 ^{3.7}	17.43 ^{3.3}	17.06 ^{2.8}	17.58 ^{2.9}	17.15 ^{2.2}	20.36 ^{4.1}
Superfície/Volume	1.89 ^{0.1}	1.88 ^{0.1}	1.89 ^{0.1}	1.87 ^{0.1}	1.88 ^{0.1}	1.78 ^{0.1}

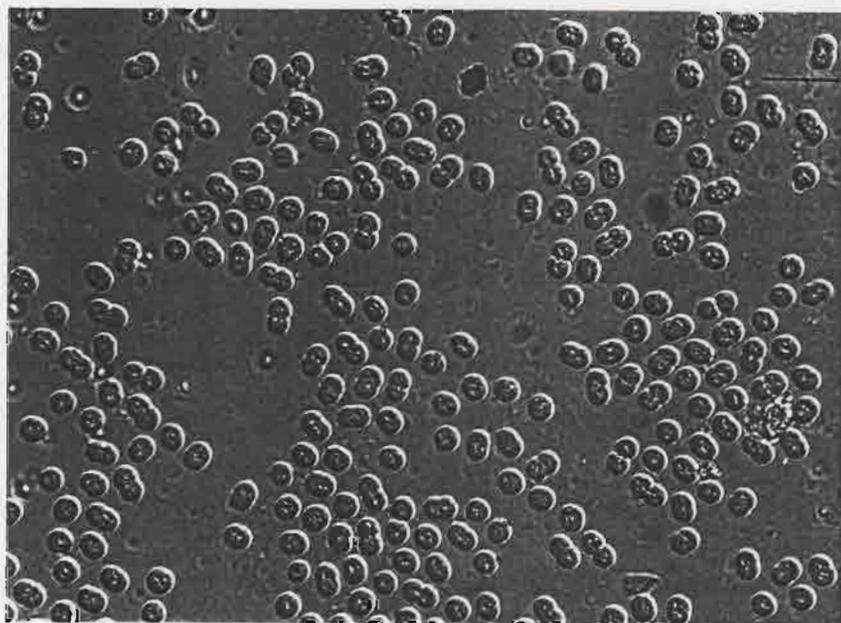


Figura 18: Foto das células de *S. aquatilis* f. *salina*, em aumento de 1000 vezes, usada na medição do tamanho celular. Células cultivadas em meio ASM-1, N/P 10:1. A barra de escala representa 10 μm .

4.3.7 - Toxinas

A análise da produção de microcistinas (hepatotoxina) por células de *S. aquatilis* f. *salina* obteve resultados negativos em todos os diferentes cultivos. Ou seja, esta toxina não foi encontrada ou se apresentou em concentrações muito baixas, não detectáveis pelo método usado. No entanto, deve-se lembrar que uma amostra do plâncton da lagoa, em que *S. aquatilis* f. *salina* representava a grande maioria da população se mostrou tóxica, como o relatado por Azevedo & Carmouze (no prelo). Deste modo, não deve-se eliminar a hipótese de que esta espécie tenha causado a mortandade de peixes, talvez pela produção de uma outra toxina.

Além disso, também deve-se considerar a hipótese de que as condições de cultivo utilizadas nesses experimentos não estimulem a síntese de microcistinas por esta espécie.

Neste trabalho foi realizada a análise deste grupo de toxinas, as microcistinas, visto que compreendem as toxinas mais frequentemente produzidas pelas cianobactérias. Existem diferentes tipos de microcistinas, que são determinados por diferentes sequências de aminoácidos. Deve-se levar em consideração que o método utilizado pode não ser sensível ao tipo de microcistina produzido por essa espécie.

Além disso, como ressaltam Azevedo & Carmouze (no prelo), a hipótese de intoxicação dos peixes por *S. aquatilis* f. *salina* é muito provável, já que o peixe mais atingido na mortandade foi um peixe filtrador, e esta cianobactéria representava 90% da densidade e biomassa fitoplanctônica neste momento. Segundo esses autores, a limitação do meio em nitrogênio teria induzido a produção, pela população de *S. aquatilis* f. *salina*, de um composto que foi fatal aos peixes. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que apesar de no ano seguinte também ter sido verificada a predominância de cianobactérias, as

concentrações de nitrogênio se encontravam mais elevadas, e assim não foram observados os sinais de estresse fisiológico verificados em janeiro de 1991 e nem a mortandade de peixes. Rodger *et al.* (1994) ressaltam que apesar de mortandades de peixes terem sido frequentemente associadas a “blooms” de algas tóxicas, tem sido difícil provar a causa exata da morte.

As influências dos fatores ambientais sobre a toxicidade de diferentes espécies de cianobactérias ainda não são bem conhecidas, principalmente o efeito dos nutrientes. Watanabe & Oishi (1985) estudando o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo sobre a toxicidade de cepas de *Microcystis aeruginosa* encontraram a tendência de diminuição da toxicidade com a diminuição da concentração destes nutrientes. Wicks & Thiel (1990) não encontraram relação entre a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* e diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. No entanto, Sivonen (1991) observou que o aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo tiveram um efeito de estimular a produção de toxinas por cepas do gênero *Oscillatoria*.

Neste trabalho, em um experimento preliminar, foi verificada a produção de microcistinas por este clone, tendo sido observada uma toxicidade dez vezes maior em células cultivadas em meio ASM-1/10, N/P 3:1, quando comparada à toxicidade de células cultivadas em meio ASM-1, N/P 10:1. O inóculo destas duas culturas foi cultivado durante dez dias em meio sem nitrogênio.

Lincoln & Carmichael (1981) já relataram a toxicidade de células de *Synechocystis* sp. usadas na alimentação de aves domésticas. Estes autores encontraram células de toxicidade variável, indicando a presença de clones com diferentes toxicidades. É possível que na Lagoa da Barra também houvessem clones desta espécie com diferentes

toxicidades, e assim um clone menos tóxico pode ter sido isolado para o estudo no laboratório.

4.3.8 - Lagoa da Barra x Experimentos de Laboratório

A partir da análise de correlação realizada com os dados do trabalho de campo, ficou evidenciado que a ocorrência da espécie *S. aquatilis* f. *salina* na Lagoa da Barra estava associada a períodos de baixa disponibilidade de nitrogênio (baixa N/P).

No trabalho desenvolvido no laboratório, pôde ser visto que esta espécie foi realmente capaz de manter um bom crescimento e uma elevada atividade fotossintética em condições de limitação de nitrogênio (meio ASM-1, N/P 3:1). Além disso, na condição de limitação mais severa (meio ASM-1/10, N/P 3:1), ela apresentou características que provavelmente seriam eficientes para sua sobrevivência até que as condições do meio se tornassem mais favoráveis. Destas características pode-se citar a manutenção de uma alta atividade fotossintética, aliada a uma menor taxa de crescimento. A estratégia de evitar a divisão celular, através de uma menor taxa de crescimento, implica na preservação da sua cota individual de nitrogênio.

Outro dado a ressaltar é que esta espécie foi capaz de aumentar sua população em 32% em média, durante os seis dias em meio sem fonte de nitrogênio, somente as custas de suas reservas nitrogenadas. A capacidade de manter o crescimento durante certo tempo após a exaustão do nitrogênio do meio, pode significar uma grande

vantagem competitiva em ambientes onde o suprimento de nitrogênio é intermitente (Dortch, 1982).

Esta espécie também apresentou uma rápida absorção de nitrogênio no início dos cultivos, após o período em meio sem este nutriente, que ficou evidenciada pelo aumento acentuado na concentração de proteínas intracelulares. Os carboidratos acumulados durante o cultivo sem nitrogênio teriam servido como substrato para a formação de esqueletos carbônicos a serem aminados e utilizados na síntese protéica, visto a diminuição das suas concentrações.

Quanto aos pigmentos, pode ser observado que a concentração de clorofila *a* das células cultivadas em meio ASM-1, razão N/P 3:1 não foi consideravelmente diferente da de células em N/P 10:1, durante a maior parte do cultivo. No meio ASM-1/10, a concentração de clorofila *a* das células em razão N/P 3:1 foi maior que a de células em razão N/P 10:1. A manutenção das concentrações de clorofila *a* em condição de limitação de nitrogênio é obviamente vantajosa. Deve-se lembrar no entanto que, apesar deste parâmetro não ter sido medido, ficou evidenciada uma diminuição acentuada na concentração de ficobilinas nos cultivos em meio ASM-1/10, N/P 3:1 e 10:1, devido a coloração amarelada destas culturas. Além disso, a diminuição destes pigmentos também deve ter ocorrido nos cultivos em meio ASM-1, N/P 3:1, devido ao menor suprimento de nitrogênio.

Tendo em vista os dados da Lagoa da Barra, deve ser lembrado que o mês de janeiro de 1991 foi caracterizado pela forte limitação em nitrogênio do meio e pela dominância da espécie *S. aquatilis* f. *salina*, que representava 90% da biomassa e densidade fitoplanctônica total (Domingos *et al.*, no prelo). Neste período também foi observada na população de *S. aquatilis* f. *salina* na Lagoa da Barra, uma coloração amarelada semelhante

a observada nas culturas de laboratório em meio ASM-1/10, N/P 3:1 e 10:1. Esta cor amarelada está muito provavelmente associada a degradação das ficobilinas, decorrente da limitação por nitrogênio, como ocorreu no laboratório. Isto confirma a forte limitação por nitrogênio sofrida pela espécie na lagoa durante este período, e indica que os cultivos atingiram o objetivo de “simular” as condições presentes na lagoa neste momento.

Outro fato a ressaltar é que foi observado na Lagoa da Barra, neste mesmo período, um aumento de mais de 100% no carbono orgânico dissolvido (COD) na coluna d'água. Este aumento no COD foi atribuído a um aumento da excreção de carboidratos por esta espécie, decorrente de uma deficiência metabólica de *S. aquatilis* f. *salina*, associada ao estresse causado pela forte limitação em nitrogênio (Domingos *et al.*, no prelo). Foi observada até mesmo uma mudança na “viscosidade” da água da lagoa, ligada provavelmente a excreção de carboidratos por esta espécie (⁵Carmouze, com. pess.). No laboratório, os maiores valores de carboidratos extracelulares foram observados no início do cultivo, período em que as células provinham da condição mais estressante; o meio sem fonte nitrogenada. Desse modo, podemos ver que o aumento na taxa de excreção de carboidratos pode estar associado a situações de estresse fisiológico, como o indicado pelos dados da Lagoa da Barra e confirmado no laboratório; o que concorda com os dados de Vieira & Cáceres (1987) em estudos sobre a excreção de carboidratos por espécies fitoplanctônicas.

Vimos no laboratório que esta espécie foi capaz de desenvolver uma atividade fotossintética relativamente alta durante limitação severa de nitrogênio, assim como foi a única espécie da comunidade fitoplanctônica da lagoa, a tolerar os períodos de maior limitação em nitrogênio. Na Lagoa da Barra, foi observado que mesmo durante o

⁵ Jean Pierre Carmouze, Université Montpellier II

período de forte carência em nitrogênio (janeiro de 1991), não houve diminuição na taxa de produção líquida do carbono orgânico (Carmouze *et al.*, no prelo a). Pelo contrário, estas taxas se mantiveram elevadas até o fim do período de pré-mortandade (Domingos *et al.*, no prelo). Esta manutenção de uma alta atividade fotossintética durante períodos de carência em nitrogênio, garante que não haja limitação de energia; se houver uma entrada de nitrogênio, a célula é capaz de utilizá-lo.

Esses dados mostram a capacidade de *S. aquatilis* f. *salina* produzir energia química, através do processo da fotossíntese, com muito pouco nitrogênio. Esta energia é acumulada na forma de carboidratos, que são em parte excretados, tornando-se disponíveis aos microheterótrofos presentes.

Segundo Zevenboom (1987), a absorção de nutrientes e a fotossíntese podem ser vistos como processos chaves no crescimento do fitoplâncton, sendo influenciados pelo ambiente atual e por características de ambientes onde a espécie ocorreu no passado. Através da adaptação a diferentes conjuntos de fatores ambientais, fenótipos diferentes com diferenças fisiológicas distintas surgem. Deste modo, esta espécie foi provavelmente selecionada, dentre as várias espécies que ocorrem na Lagoa da Barra, em situações de limitação por nitrogênio, de acordo com suas características vantajosas nesta condição.

Deve-se ressaltar que esta espécie provavelmente apresenta outras adaptações, além das estudadas no laboratório. Como se trata de uma espécie pequena, com uma alta relação superfície/volume, ela apresenta uma maior área de absorção de nutrientes, e assim uma maior eficiência de assimilação. Stockner & Antia (1986) e Stockner & Shortreed (1988) sugerem que a capacidade do picoplâncton em assimilar nutrientes em concentrações ambientais extremamente baixas confere uma vantagem seletiva à estes

pequenos autótrofos em ecossistemas empobrecidos. Além disso, esta espécie pode apresentar uma maior afinidade pelo nitrogênio do que as outras espécies presentes na lagoa, por exemplo apresentando um menor valor de K_s para o nitrogênio, o que aumenta sua capacidade de competir por este nutriente com sucesso. Estudos a respeito da cinética das enzimas envolvidas nos processos de absorção e assimilação deste nutriente seriam interessantes para identificar os mecanismos bioquímicos usados por estas células. Outra hipótese a considerar é a de que esta espécie seja capaz de utilizar o nitrogênio contido na fração orgânica dissolvida (NOD).

Segundo Carmouze *et al.* (no prelo b), as cianobactérias asseguraram uma utilização mais eficaz do nitrogênio disponível; e graças às suas menores cotas de subsistência em nitrogênio (baseado em Shuter, 1978), esses microorganismos puderam manter uma biomassa por determinada quantidade de nitrogênio, superior a de outras espécies fitoplanctônicas presentes na lagoa. Além disso, esses autores também sugerem que as cianobactérias são mais eficientes em adquirir o nitrogênio, e sobretudo dispõem de mecanismos internos que as permitem conservar seus estoques de nitrogênio.

Apesar da concentração de nitrogênio utilizada nos cultivos não ter sido tão baixa quanto as medidas na lagoa, estas podem ser consideradas limitantes ao crescimento das células, já que são muito baixas em relação as de outros meios de cultura, especialmente no meio ASM-1/10. O objetivo do cultivo em meio ASM-1/10 foi submeter esta espécie a uma condição de limitação em nutrientes e especialmente em nitrogênio, como ocorreu na lagoa. Este objetivo foi alcançado, visto que as células cultivadas em meio ASM-1/10 apresentaram sinais de estresse fisiológico causados pela limitação em nitrogênio, como a cor amarelada. Cabe ressaltar que não seria possível manter uma cultura em laboratório com as concentrações de nitrogênio inorgânico medidas na lagoa. Desse modo, não devemos

comparar as concentrações absolutas dos nutrientes nos cultivos e na lagoa, mas sim a resposta fisiológica da célula.

Além disso, é importante ressaltar que a detecção de baixas concentrações de um nutriente no meio deve ser interpretada com cautela. Isto porque o uso e a regeneração dos nutrientes pode ser realizada tão rapidamente que suas concentrações na coluna d'água parecem não sofrer mudanças (Harris, 1986, Flynn, 1990).

De acordo com Domingos *et al.* (no prelo), na Lagoa da Barra a reciclagem é rápida e de maneira quase contínua, de modo que as concentrações de nutrientes são mantidas sempre baixas. Essa reciclagem determina uma entrada permanente de nutrientes no meio pelágico. Sakshaug & Oslen (1986) ressaltam que a taxa de suprimento de nutrientes pode determinar que espécies competirão com sucesso em um dado sistema.

⁶ McCarthy & Goldman (1979) citados em Darley (1982), chamam a atenção para o fato de que as células fitoplanctônicas respondem a volumes na ordem de μl , enquanto as análises de nutrientes são usualmente realizadas em volumes de 50 ml. Assim, os "micropatches" que podem existir como resultado da excreção pelo zooplâncton ou da remineralização bacteriana não são detectáveis.

Apesar da concentração dos nutrientes *in situ* não ser um indicador confiável da condição de limitação ou suficiência em um nutriente, deve ser ressaltado que a baixa razão N/P na coluna d'água, (razões NID/PO_4 , NOP/POP , NO_3/PT e NT/PT), foi muito bem correlacionada a ocorrência de cianobactérias na Lagoa da Barra. Além disso, Domingos *et al.* (no prelo) concluem que a disponibilidade de nitrogênio foi uma importante variável de controle da composição fitoplanctônica, no período de outubro de 1990 a junho

⁶ McCarthy, J.J. & Goldman, J.C. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient-depleted waters. *Science* v. 203: 670-672, 1979.

de 1991, mas que no entanto, outros fatores poderiam mascarar sua ação seletiva em determinadas condições.

Deste modo, a razão N/P parece ter sido um fator importante na dominância das cianobactérias, especialmente de *S. aquatilis* f. *salina* durante grande parte do estudo. O sucesso desta espécie sobre as demais, durante períodos de baixa razão N/P, está provavelmente relacionado ao seu pequeno tamanho, sua baixa cota de subsistência de nitrogênio, à presença de compostos nitrogenados de reserva (cianoficinas), à provável capacidade de utilizar o nitrogênio orgânico dissolvido e à capacidade de redistribuir o nitrogênio contido nas ficobiliproteínas segundo suas necessidades. Essas características permitiram o desenvolvimento das altas taxas de crescimento e fotossintética observadas nos cultivos sobre limitação de nitrogênio.

Além disso, o N/P celular ótimo é provavelmente uma característica específica de cada espécie. Desse modo, diferenças nesta razão celular podem ter um importante significado ecológico, podendo ser a base para a coexistência ou a exclusão competitiva entre espécies (Rhee, 1978). É possível que *S. aquatilis* f. *salina* apresente uma razão N/P celular menor que a da maioria das espécies presentes na Lagoa da Barra.

É importante dizer que apesar de haverem relatos sobre a fixação de nitrogênio por espécies unicelulares de cianobactérias, Philips *et al.* (1989) para o gênero *Synechococcus* e Brass *et al.* (1994) para o gênero *Synechocystis*, este processo só acontece na ausência de oxigênio, sob condições bem específicas. Os cultivos realizados neste trabalho foram sempre aerados com ar atmosférico filtrado, havendo uma entrada permanente de oxigênio. Além disso, a aeração gera uma turbulência que desestruturaria as microzonas anóxicas, que segundo Paerl *et al.* (1995) são essenciais para que ocorra o

processo de fixação de nitrogênio atmosférico, por cianobactérias que não possuem heterocistos.

No entanto, a baixa razão N/P sozinha não é capaz de explicar todos os períodos de dominância por esta espécie. Deve-se considerar também outras hipóteses a respeito da dominância das cianobactérias, como a baixa taxa de pastagem pelo zooplâncton sobre as cianobactérias (Reynolds, 1984), relatada por Arcifa *et al.* (no prelo) para a Lagoa da Barra. Além disso, deve-se lembrar que houve correlação significativa positiva entre o pH e a biomassa de cianobactérias. Isto significa dizer que a ocorrência de cianobactérias também está associada a altos valores de pH, como sugerido por Shapiro (1990), devido a menor concentração de CO₂ nestes valores de pH. Outros fatores que também podem ser considerados são as temperaturas elevadas (Tilman *et al.*, 1986, McQueen & Lean, 1987, Pick & Lean, 1987, Robarts & Zohary, 1987) e o nitrogênio sob a forma de amônia (Hyenstrand, 1994, Hyenstrand *et al.*, 1995, Blomqvist *et al.*, 1994), sugerida para a Lagoa da Barra por Pereira-Filho (1995).

Dessa maneira, a dominância de cianobactérias na Lagoa da Barra é provavelmente o resultado de vários fatores que atuam concomitantemente. O estudo realizado com culturas de laboratório mostrou que esta espécie está adaptada a limitação por nitrogênio, apresentando estratégias fisiológicas eficientes nesta condição. Sendo assim, a baixa disponibilidade de nitrogênio, evidenciada pela baixa razão N/P parece ter sido um fator importante na determinação do sucesso desta espécie na comunidade estudada.

5 - Conclusões

- A correlação realizada entre as concentrações de nutrientes e a biomassa de cianobactérias durante todo o período de estudo na Lagoa da Barra mostrou que a ocorrência destes organismos esteve significativamente relacionada a períodos de baixa disponibilidade de nitrogênio em relação ao fósforo.

- O rendimento máximo, em termos do número de células alcançado pela cultura, foi o parâmetro que melhor evidenciou o grau de limitação do crescimento sofrido pela espécie.

- A concentração de proteínas intracelulares em cada um dos cultivos foi uma função da quantidade de nitrogênio disponível em cada um dos meios, as maiores concentrações sendo obtidas nos meios com razão N/P 30:1.

- No meio ASM-1/10, N/P 3:1 a quantidade de nitrogênio disponível às células parece não ter sido suficiente para sustentar uma considerável síntese protéica, visto que estas células já se encontravam seriamente exauridas deste nutriente no início do cultivo. Desta forma, estas células não foram capazes de sustentar um bom crescimento.

- Apesar das células cultivadas em meio ASM-1, N/P 30:1 terem apresentado as maiores concentrações de proteínas ao longo do cultivo, estas células não foram capazes de desenvolver um bom crescimento, apresentando um rendimento máximo muito inferior ao do cultivo em meio ASM-1, N/P 10:1.

- A concentração de clorofila α foi uma função da disponibilidade de nitrogênio no meio ASM-1, maiores valores sendo encontrados no meio com maior razão N/P (30:1). No meio ASM-1/10 não foi encontrada uma diferença marcante nas concentrações de clorofila α nas diferentes razões N/P. Esta manutenção da clorofila intracelular mesmo nas células sofrendo limitação severa em nitrogênio e outros nutrientes (ASM-1/10, N/P 3:1) deve ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento das taxas fotossintéticas relativamente altas observadas.

- Este estudo mostra a importância de se medir vários parâmetros fisiológicos concomitantemente (carboidratos, proteínas, clorofila) em estudos que visam caracterizar o estado fisiológico da espécie e sua relação com o crescimento.

- O período onde foi observada a maior taxa de excreção de carboidratos coincidiu com o período de maior estresse fisiológico vivenciado pela célula, o primeiro dia do cultivo, quando as células provinham de seis dias em meio sem nitrogênio.

- As células cultivadas em meio ASM-1/10, N/P 3:1 apresentaram uma atividade fotossintética relativamente alta durante a fase exponencial de crescimento, apesar de estarem sofrendo uma severa limitação em nitrogênio e outros nutrientes. Esta elevada atividade fotossintética aliada a uma baixa taxa de crescimento mantém a célula viva durante períodos de condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento e caracteriza uma estratégia importante na Lagoa da Barra.

- Apesar de não ter sido observada a produção de microcistinas em nenhum desses cultivos, a hipótese de que esta espécie teria produzido um composto responsável pela intoxicação dos peixes *Brevoortia tyrannus*, em fevereiro de 1991 na Lagoa da Barra não pode ser descartada. Novos testes são necessários.

- As diferentes condições de cultivo utilizadas neste estudo não causaram nenhuma mudança considerável no tamanho da célula de *S. aquatilis* f. *salina*, apesar das diferenças fisiológicas observadas entre as células de cada um dos cultivos.

- Esta espécie se mostrou bem adaptada a uma condição de limitação em nitrogênio, visto que exibe elevadas taxas fotossintética e de crescimento, além de altas concentrações de proteínas e clorofila *a* intracelulares quando cultivada em meio com limitação somente de nitrogênio (ASM-1, N/P 3:1). Além disso, o cultivo em meio com razão N/P 30:1 mostrou que o mesmo não se repete quando a espécie é cultivada em valores mais altos desta razão.

- Este estudo confirma a tendência observada no trabalho de campo, e descrita na literatura, evidenciando um melhor desempenho relativo de espécies de cianobactérias, em condições de baixa razão N/P.

- Parâmetros como a coloração amarelada das culturas e as altas taxas de excreção de carboidratos, além da manutenção de elevadas taxas fotossintéticas sob limitação de nitrogênio, indicam que as condições observadas na lagoa conseguiram ser simuladas no laboratório.

- O bom desempenho exibido pela espécie em condições de baixa razão N/P deve ter sido um fator importante na determinação do seu sucesso competitivo na comunidade fitoplanctônica da Lagoa da Barra. Entretanto, fatores como a baixa taxa de predação pelo zooplâncton e altos valores de pH e temperatura também devem ser levados em consideração.

6 - Referências Bibliográficas

- AGUIAR, D.G. Efeitos de diferentes concentrações de nutrientes no crescimento e produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa* Kutz emend. Elekin (Cyanophyceae), em condições de cultivo. Rio de Janeiro, 1995. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- AIDAR, E., EHRLICH, R., ASANO, C. S. & SIGAUD, T.C.S. Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin), em cultivos estanques. Bolm. Inst. Oceanogr. v. 39 n, p. 2: 131-139, 1991.
- ALLEN, M.M. & HUTCHISON, F. Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. Arch. Microbiol. v.128, p. 1-7, 1980.
- ALLEN, M.M., LAW, A. & EVANS, H. Control of photosynthesis during nitrogen depletion and recovery in a non-nitrogen-fixing cyanobacterium. Arch. Microbiol. v. 153, p. 428-431, 1990.
- ANDRADE, L., AZEVEDO, S.M.F.O. & PFEIFFER, W.C. Effects of zinc concentrations in phytoplankton species from Sepetiba Bay (Brazil). Arq. Biol. Tecnol. v. 37 n. 3, p. 655-666, 1994.
- ARCIFA, M.S., CASTILHO, M.S.M. & CARMOUZE, J.-P. Composition et évolution du zooplancton d'une lagune tropicale (Brésil): Conséquences d'une mortalité massive de poissons. Rev. Hydrobiol. Trop., (1995, no prelo).
- AZEVEDO, S.M.F.O., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Appl. Phycol. v. 6, p. 261-265, 1994.
- AZEVEDO, S.M.F.O. & CARMOUZE, J.-P. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de cyanophycées. Coincidence ou conséquence? Rev. Hydrob. Trop., (1995, no prelo).
- BARROSO, L.V., PERRIN, P. & CARMOUZE, J.-P. Le système lagunaire de Maricá-Guarapina et ses modifications écologiques récentes d'origine anthropique. Rev. Hydrob. Trop., (1995, no prelo).

- BERNARDES, M.C. & CARMOUZE, J.-P. Fractionation of particulate and dissolved organic matter during an annual cycle in a Brazilian coastal lagoon. In: PERSPECTIVES FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY IN TROPICAL COUNTRIES, 1993, Niterói: UFF/Departamento de Geoquímica, 1993. 486p. p.175-178.
- BERNARDES, M.C. As atividades biológicas relacionadas com o C, N e P das diferentes frações da matéria orgânica durante um ciclo anual na Lagoa da Barra, Maricá-RJ, Brasil. Niterói, 1995. 138 p. Dissertação (Mestrado em Geociências-Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- BERNARDES, M.C., KUROSHIMA, K.N. & CARMOUZE, J.P. The different fractions of organic matter (C,N,P) and its annual changes in an eutrophic brazilian coastal lagoon. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS A LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.320.
- BLOMQUIST, P., PETTERSON, A. & HYENSTRAND, P. Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. Arch. Hydrobiol., v.132, p.141-164, 1994.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASS, S., WESTERMANN, M., ERNST, A., REUTER, W., WEHRMEYER, W. & BOGER, P. Utilization of light for nitrogen fixation by a new *Synechocystis* strain is extended by its low photosynthetic efficiency. Appl. Environ. Microbiol. v.60 n.7, p. 2575-2583, 1994.
- BROCK, T.D. Lower pH limit for the existence of blue-green: evolutionary and ecological implications. Science v. 179, p. 480-483, 1973.
- BRYANT, D.A. The cyanobacterial photosynthetic apparatus: Comparisons to those of higher plants and photosynthetic bacteria. In: Platt, T. & Li, W.K.W. (eds). "Photosynthetic Picoplankton". Can. Bull. Fish. Aquatic. Sci. v. 214, p. 423-500, Department Fisheries and Oceans, Ottawa, Canada. 1987.
- CAPERON, J. Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. Ecology, v. 49 n. 5, p. 866-872, 1968.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. J.Appl.Bact., v.72, p. 445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. Scient. Am. v. 270 n.1, p. 78-86, 1994.
- CARMOUZE, J.-P., SAMPAIO, C.D. & DOMINGOS, P. Évolution des pools de matière organique et des nutriments dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période marquée par une mortalité de poissons. Rev. Hydrob. Trop., (1995, no prelo).

- CARMOUZE, J.-P., FARIAS, B.M.d. & DOMINGOS, P. Évolution du métabolisme d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. Rev. Hydrob. Trop., (1995, no prelo).
- CASTILHO, M.S.M. & ARCIFA, M.S. Composition and fluctuations of the zooplankton in a brazilian coastal lagoon, Barra Lagoon, Maricá, Rio de Janeiro. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS A LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.407.
- CHU, F.S., XUAN HUANG, WEI, R.D. & CARMICHAEL, W.W. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. Environ. Microbiol. v.55 n. 8, p. 1928-1933, 1989.
- CHU, F.S., XUAN HUANG & WEI, R.D. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Assoc. Anal. Chem. v.73 n.3, p. 451-456, 1990.
- DARLEY, W.M. Algal biology: a physiological approach. London: Blackwell Sci. Publ. 1982. 168 p.
- DOMINGOS, P., HUSZAR, V.L. & CARMOUZE, J.-P. Composition et biomasses du plancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. Rev. Hydrob. trop., (1995, no prelo).
- DOMINGOS, P., CASTILHO, M.S.M., ARCIFA, M.S., HUSZAR, V.L.M. & CARMOUZE, J.-P. Planktonic communities of a tropical coastal lagoon: temporal variations. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS A LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.339.
- DORTCH, Q. Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. v. 61, p. 243-264, 1982.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUKE, C.S. & ALLEN, M.M. Effect of nitrogen starvation on polypeptide composition, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and thylakoid carotenoprotein content of *Synechocystis* sp. strain PCC6308. Plant Physiol. v. 94, p. 752-759, 1990.
- EBERLEIN, K. & BROCKMANN, U.H. Development of particulate and dissolved carbohydrates in parallel enclosure experiments with monocultures of *Thalassiosira rotula*. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 32, p. 133-138, 1986.

- EVEREST, S.A., HIPKIN, C.R. & SYRRET, P.J. Enzyme activities in some marine phytoplankters and the effect of nitrogen limitation on nitrogen and carbon metabolism in *Chlorella stigmatophora*. Mar. Biol. v. 90, p. 165-172, 1986.
- FARIA, B.M.d., SAMPAIO, C.D. & CARMOUZE, J.-P. Metabolism of the Barra Lagoon, Maricá-RJ, related to a dystrophic crisis. In: PERSPECTIVES FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY IN TROPICAL COUNTRIES, 1993, Niterói: UFF/Departamento de Geoquímica, 1993. 486p. p.173-178.
- FARIA, B.M.d. Metabolismo e crises distróficas na Lagoa da Barra, Maricá, Rio de Janeiro. Niterói, 1993. 84 p. Dissertação (Mestrado em Geociências - Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- FLETT, R.J., SCHINDLER, D.W., HAMILTON, R.D. & CAMPBELL, N.E.R. Nitrogen fixation in Canadian precambrian shield lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. v. 37, p. 494-505, 1980.
- FLYNN, K.J. The determination of nitrogen status in microalgae. Mar Ecol. Prog. Ser. v. 61, p. 297-307, 1990.
- FOGG, G.E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. Bot. Mar. v. 26, p. 3-14, 1983.
- FOGG, G.E. & THAKE, B. Algal cultures and phytoplankton ecology. 3. ed. London: The University of Wisconsin Press, 1987. 269 p.
- FOY, R.H. The influence of surface to volume ratio on the growth rates of planktonic blue-green algae. Br. Phycol. v. 15, p. 279-289, 1980.
- FOY, R.H. The phycocyanin to chlorophyll a ratio and other cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low-light exposures. J. Plankton Res. v. 15, n.11, p. 1263-1276, 1993.
- FOY, R.H. & SMITH, R.V. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. Br. Phycol. J. v. 15, p. 139-150, 1980.
- GEIDER, R. J. & OSBORNE, B. A. Algal photosynthesis: the measurement of algal gas exchange. London: Chapman & Hall, 1992. 256 p. Cap. 1: Net gas exchange, p. 1-31.
- GIBSON, C.E. & SMITH, R.V. Freshwater plankton. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A. (eds.) The biology of cyanobacteria. Boston: Alden Press Oxford, 1982. 688 p. Cap. 18, pp 463-490.
- GOLDMAN, J. C. & BREWER, P. G. Effect of nitrogen source and growth rate on phytoplankton-mediated changes in alkalinity. Limnol. Oceanogr. v. 25, p. 352-357, 1980.
- GORHAM, P.R., Mc LACHLAN, U.T., HAMMER, U.T. & KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos aquae* (Lyngb.) de Bréb. Verh. Internat. Verein. Limnol. v. 15, p. 796-804, 1964.

- GUERRERO, M.C. & LARA, C. Assimilation of inorganic nitrogen. In: FAY & VAN BAALEN (eds). The Cyanobacteria. Amsterdam: Elsevier, 1987. Cap. 6, p. 163-168.
- HARRIS, G.P. Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation. London: Chapman and Hall, 1986. 385 p.
- HARRISON, P.J., THOMPSON, P.A. & CALDERWOOD, G.S. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Appl. Phycol. v. 2, p. 45-56, 1990.
- HEALEY, F. P. Phosphate. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A. (eds.) The biology of cyanobacteria. Boston: Alden Press Oxford, 1982. 688 p. Cap. 5, p. 105-125.
- HUMPHRIES, S.E. & LYNE, V.D. Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. Limnol. Oceanogr. v. 33, n.1, p. 79-91, 1988.
- HYENSTRAND, P. The importance of inorganic nitrogen species as regulatory factors for cyanobacterial dominance. Scripta Limnologica Upsaliensia, v.B, n.3, 1994.
- HYENSTRAND, P., PETTERSON, A. & BLOMQUIST, P. The importance of inorganic nitrogen species as regulatory factors for cyanobacterial dominance. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.355.
- KANA, T.M., FEIWEL, N.L. & FLYNN, L.C. Nitrogen starvation in marine *Synechococcus* strains: clonal differences in phycobiliprotein breakdown and energy coupling. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 88, p. 75-82, 1992.
- KNOPPERS, B., KJERFVE, B. & CARMOUZE, J.-P. Trophic state and water turn-over in six choked coastal lagoons in Brazil. Biogeochemistry, v.16, p. 149-166, 1991.
- KROMKAMP, J. Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. N. Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 457-465, 1987.
- KUROSHIMA, K.N., BERNARDES, M.C. & CARMOUZE, J.-P. Decomposition of organic matter in Lagoa da Barra (Maricá-RJ). In: PERSPECTIVES FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY IN TROPICAL COUNTRIES, 1993, Niterói: UFF/Departamento de Geoquímica, 1993. 486p. p.215-218.
- KUROSHIMA, K.N. Decomposição da matéria orgânica no sedimento da Lagoa da Barra - Maricá, Rio de Janeiro. Niterói, 1995. p. Dissertação (Mestrado em Geociências - Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- LAPOINTE, B.E. & DUKE, C.S. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. J. Phycol. v. 20, p. 488-495, 1984.

- LEWIS, W.M.Jr. Surface/volume ratio: Implications for phytoplankton morphology. Science v. 192, p. 885-887, 1976.
- LINCOLN, E.P. & CARMICHAEL, W.W. Preliminary tests of toxicity of *Synechocystis* sp. grown on wastewater medium. In: CARMICHAEL, W.W (ed.). The water environment: Algal toxins and health. New York: Plenum Press, 1981. p. 223-230.
- MACKINNEY, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. v. 140, p. 315-322, 1941.
- Mc CORMICK, P.V. & CAIRNS, J. Algae as indicators of environmental change. J. Appl. Phycol. v. 6, p. 509-526, 1994.
- Mc QUEEN, D.J. & LEAN, D.R.S. Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in Lake St George, Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. v. 44, p. 598-604, 1987.
- MITSUI, A., ROSNER, D., GOODMAN, A., REYES-VASQUEZ, G., KUSUMI, T., KODAMA, T. & NOMOTO, K. Hemolytic toxins in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. In: TOMOTOSHI, O. ANDERSON, D. M. & NEMOTO, T. (eds). Red tides: Biology, environmental science and toxicology. Amsterdam: Elsevier. p. 367-370, 1989.
- MYKLESTAD, S. & HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. v.9, p. 125-136, 1972.
- MORRIS, I. Photosynthetic products, physiological state, and phytoplankton growth. Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. v.210, p. 83-102, 1981.
- MURPHY, T.P. & LEAN, D.R.S. The distribution of iron in a closed ecosystem. Verh. Int. Ver. Limnol. v. 19, p.258-266, 1975.
- NASCIMENTO, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. Growth of *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (blue-green algae) on different nitrogen:phosphorus ratios - Ecophysiological approach. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS A LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.360.
- ORMEROD, J.G. Physiology of the photosynthetic prokaryotes. In: MAN, N.H. & CARR, N.G. (eds). Photosynthetic Prokaryotes. Biotechnology Handbooks, v. 6. Nova York: Plenum Press. p. 93-117, 1992.
- PAERL, H. W. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. Limnol. Oceanogr. v. 33, n.4, part 2, p. 823-847, 1988.

- PAERL, H. W., PINCKNEY, J.L. & KUCERA, S.A. Clarification of the structural and functional roles of heterocysts and anoxic microzones in the control of pelagic nitrogen fixation. Limnol. Oceanogr. v.40 n.3, p. 634-638, 1995.
- PEREIRA-FILHO, J., CARMOUZE, J.-P. & NASCIMENTO, S.M. Evolution of ecosystem metabolism during 20 days in a tropical lagoon. In: PERSPECTIVES FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY IN TROPICAL COUNTRIES, 1993, Niterói: 1993. p. 219-222.
- PEREIRA-FILHO, J., BERNARDES, M.C., SILVA-LINS, V.I. & CARMOUZE, J.-P. Changes of biological activity and biogenic elements (C,N,P) related with a fish mortality in an eutrophic tropical lagoon: Lagoa da Barra, RJ, Brazil. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY. WATER AS A LIMITING RESOURCE: CONSERVATION AND MANAGEMENT, 26, 1995, São Paulo. Abstracts. São Paulo: Polipress, 1995. 456p. p.252.
- PEREIRA-FILHO, J. Variabilidade interanual do metabolismo associado às comunidades planctônicas e à distribuição dos elementos biogênicos na Lagoa da Barra, RJ, Brasil. Niterói, 1995. p. Dissertação (Mestrado em Geociências - Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- PHILIPS, E.J., ZEMAN, C. & HAMSEN, P. Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). J. Appl. Phycol. v.1, p. 137-145, 1989.
- PICK, F.R. & LEAN, D.R.S. The role of macronutrients (C,N,P) in controlling cyanobacterial dominance in temperate lakes. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 425-434, 1987.
- PICK, F.R. Carbohydrate and protein content of lake seston in relation to plankton nutrient deficiency. Can J. Fish. Aquat. Sci. v. 44, p. 2095-2101, 1987.
- REYNOLDS, C.S. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 384 p.
- REYNOLDS, C.S., OLIVER, R.L. & WALSBY, A.E. Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 379-390, 1987.
- RHEE, G. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr. v. 23, n.1, p. 10-25, 1978.
- ROBARTS, R.D. & ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 391-399, 1987.
- RODGER, H.D., TURNBULL, T., EDWARDS, C. & CODD, G.A. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. J. Fish Diseases v. 17, p. 177-181, 1994.

- RUETER, J.G. & PETERSEN, R.R. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 435-445, 1987.
- SAKSHAUG, E. & OLSEN, Y. Nutrient status of phytoplankton blooms in Norwegian waters and algal strategies for nutrient competition. Can. J. Fish. Aquat. Sci. v. 43, p. 389-396, 1986.
- SAMPAIO, C.T.D. Estudo da dinâmica dos principais elementos biogênicos (C, N e P) na Laguna da Barra, Maricá, Rio de Janeiro. Niterói, 1994. p. Dissertação (Mestrado em Geociências - Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- SCHINDLER, D.W. Evolution of phosphorus limitation in lakes. Science v. 195, p. 260-262, 1977.
- SHAPIRO, J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for importance of CO₂ and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. v.24, p. 38-54, 1990.
- SHUTER, B.J. Size dependence of phosphorus and nitrogen substance quotas in unicellular microorganisms. Limnol. Oceanogr. v. 23, p. 1248-1255, 1978.
- SILVA-LINS, V.I. & CARMOUZE, J.-P. Metabolism and distribution of biogenic elements in a shallow tropical lagoon on an annual scale. In: PERSPECTIVES FOR ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY IN TROPICAL COUNTRIES, 1993, Niterói: UFF/Departamento de Geoquímica, 1993. 486p. p.209-213.
- SIVONEM, K. Effects of temperature, light, nitrogen and phosphorus on hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. v. 56 n. 9, p. 2658-2666, 1991.
- SKULBERG, O.M., CODD, G.A. & CARMICHAEL, W.W. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. Ambio v. 13, p. 244-247, 1984.
- SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science, v.221, p. 669-671, 1983.
- SMITH, V.H. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. v. 43, p. 148-153, 1985
- STEVENS, S.E.Jr., BALKWILL, D.L. & PAONE, D.A.M. The effect of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Arch. Microbiol. v. 130, p. 204-212, 1981.
- STOCKNER, J.G. & ANTIA, N.J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. Can. J. Fish. Aquat. Sci. v. 43, p. 2472-2503, 1986.
- STOCKNER, J.G. & SHORTREED, K.S. Response of *Anabaena* and *Synechococcus* to manipulation of nitrogen:phosphorus ratios in a lake fertilization experiment. Limnol. Oceanogr. v. 33, n.6, part 1 p. 1348- 1361, 1988.

- STRICKLAND, J.H.D. & PARSONS, T.R. A practical handbook of sea-water analysis. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 311 p., 1968. (Fisheries Research Board of Canada, 167).
- SYRETT, P.J. Nitrogen metabolism of microalgae. In: T. Platt (Ed.): Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. v. 210 p. 182-210, 1981.
- THOMPSON, P.A., LEVASSEUR, M.E. & HARRISON, P.J. Light limited growth on ammonium vs nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? Limnol. Oceanogr. v. 34 n.6, p. 1014-1024, 1989.
- TILMAN, D., KILHAM, S.S. & KILHAM, P. Phytoplankton community ecology: The role of limiting nutrients. Ann. Rev. Ecol. Syst. v. 13, p. 349-372, 1982
- TILMAN, D., KIESLING, R., STERNER, R., KILHAM, S.S. and JOHNSON, F.A. Green, bluegreen and diatom algae: Taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. Arch. Hydrobiol. v. 106 n.4, p. 473-485, 1986.
- TILZER, M.M. Light dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. New. Zeal. J. Mar. Fresh. Res. v. 21, p. 401-412, 1987.
- TRIMBEE, A.M. & PREPAS, E.E. Evaluation of total phosphorus as a predictor of the relative biomass of blue-green algae with emphasis on Alberta lakes. Can J. Fish Aquat. Sci. v. 44, p. 1337-1342, 1987.
- TURPIN, D.H. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. J. Phycol. v. 27, p. 14-20, 1991.
- VAN RIJN, J. & SHILO, M. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effect on macromolecular synthesis. Appl. Envir. Microbiol. v.52, n. 2, p. 340-344, 1986.
- VIEIRA, A.A.H. & CÁCERES, O. Excreção de carboidratos solúveis por microalgas de água doce. I. Comparação de nove diferentes espécies em quatro meios de cultura. Ciência e Cultura v.39 n.1, p. 1070-1074, 1987.
- WARD, A.K. & WETZEL, R.G. Interactions of light and nitrogen source among planktonic blue-green algae. Arch. Hydrobiol. v. 90 n.1, p. 1-25, 1980.
- WATANABE, M.F. & SHINSHI, O. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. v.49, n.5, p. 1342-1344, 1985.
- WEISSHAAR, H. & BOGER, P. Nitrogenase activity of the non-heterocystous cyanobacterium *Phormidium foveolarum*. Arch. Microbiol. v. 136: 270-274, 1983.
- WHITTON, B. A. & CARR, N. G. The biology of cyanobacteria. Boston: CARR, N. G & WHITTON, B. A., 1982. 688p. Cap. 1: Cyanobacteria: current perspectives, p. 1-8.

- WICKS, R.J. & THIEL, P.G. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. Environ. Sci. Technol. v. 24, p.1413-1418, 1990.
- ZEVEMBOOM, W. & MUR, L.R. N₂-fixing cyanobacteria. Why they do not became dominating in Dutch hypereutrophic lakes. In: BARICA, J. & MUR, L.R. (eds). Hypereutrophic ecosystems. Junk, the Hague. 1980.
- ZEVEMBOOM, W. Ecophysiology of nutrient uptake, photosynthesis and growth. In: T. Platt and W.K.W. Li. (eds) "Photosynthetic Picoplankton", Can. Bull. Fish. Aquatic Sci. v. 214, p. 391-422, 1987.