

RICARDO YUKIO HONDA

**Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp. (Cyanobacteria / Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração em Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO  
2005

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Honda, Ricardo Yukio  
H771e Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp.  
(Cyanobacteria / Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo  
/ Ricardo Yukio Honda -- São Paulo, 2005.  
81 p. il.

Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio  
Ambiente, 2005  
Bibliografia.

1. Algas. 2. Cyanobacteria. 3. *Microcystis*. I. Título

CDU 582.26



RICARDO YUKIO HONDA

**Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp. (Cyanobacteria / Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração em Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA TERESA DE PAIVA AZEVEDO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à querida orientadora Dra. Maria Teresa de Paiva Azevedo, ao Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente - São Paulo) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (processo nº. 132420/2003-1).

Pelo fornecimento das amostras da natureza, agradeço à Cacilda T.J. Mercante, Célia L. Sant'Anna, Denise C. Bicudo, Fabíola M. Oshiro, José M.S. Vieira, Maria Teresa de P. Azevedo e Pedro A.C. Senna. Agradeço à Suzana Ursi pelo auxílio na análise estatística e à Fabíola M. Oshiro pela formatação da dissertação.

## Sumário

|                                                                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>1</b>  |
| <b>Objetivos .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>7</b>  |
| <b>Material e métodos .....</b>                                                                                                                                                              | <b>8</b>  |
| <b>1. Cepas estudadas e condições de cultura .....</b>                                                                                                                                       | <b>8</b>  |
| <b>2. Determinação das curvas de crescimento nas condições de manutenção do banco de culturas .....</b>                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>3. Análise da variabilidade morfométrica de <i>Microcystis</i> spp. nas condições de manutenção do banco de culturas e natureza .....</b>                                                 | <b>10</b> |
| <b>4. Experimento em cultura: variação de irradiância e temperatura (gradiente-cruzado) ...</b>                                                                                              | <b>12</b> |
| 4.1. Produção de biomassa .....                                                                                                                                                              | 12        |
| 4.2. Gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                                                                                    | 12        |
| 4.3. Análise do crescimento de <i>Microcystis</i> spp. no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                               | 13        |
| 4.4. Análise da estabilidade morfométrica de <i>Microcystis</i> spp. no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                 | 13        |
| <b>5. Proposição do ciclo de vida de <i>Microcystis</i> spp. ....</b>                                                                                                                        | <b>13</b> |
| <b>6. Análise estatística dos dados .....</b>                                                                                                                                                | <b>13</b> |
| <b>Resultados e discussão .....</b>                                                                                                                                                          | <b>15</b> |
| <b>1. Curvas de crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC522, <i>M. panniformis</i> SPC702 e <i>M. wessenbergii</i> SPC771 nas condições de manutenção do banco de culturas .....</b> | <b>15</b> |
| <b>2. Análises morfométricas e de desenvolvimento de <i>Microcystis</i> spp. em cultivo e natureza .....</b>                                                                                 | <b>16</b> |
| 2.1. <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846 .....                                                                                                                              | 16        |
| 2.1.1. Variabilidade morfométrica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; $23 \pm 1$ °C; $20\text{-}25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e natureza .....                 | 16        |
| 2.1.2. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                                       | 20        |
| 2.1.3. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza .....                                                                     | 23        |
| 2.2. <i>Microcystis panniformis</i> Komárek et al. 2002 .....                                                                                                                                | 25        |

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1. Variabilidade morfométrica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; $23 \pm 1$ °C; 20-25 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e natureza ..... | 25 |
| 2.2.2. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                | 27 |
| 2.2.3. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza .....                                              | 34 |
| <br>2.3. <i>Microcystis wesenbergii</i> (Komárek) Komárek in Kondrateva 1968 .....                                                                                    | 34 |
| 2.3.1. Variabilidade morfométrica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; $23 \pm 1$ °C; 20-25 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e natureza ..... | 34 |
| 2.3.2. Experimento adicional para cepa SPC771 .....                                                                                                                   | 43 |
| 2.3.3. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura .....                                                                | 52 |
| 2.3.4. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza .....                                              | 57 |
| 2.3.5. Diâmetro celular entre linhagens brasileiras e japonesas .....                                                                                                 | 57 |
| <br><b>Discussão geral</b> .....                                                                                                                                      | 61 |
| <b>Conclusões e sugestões</b> .....                                                                                                                                   | 66 |
| <b>Resumo</b> .....                                                                                                                                                   | 67 |
| <b>Abstract</b> .....                                                                                                                                                 | 67 |
| <b>Referências</b> .....                                                                                                                                              | 69 |
| <b>Anexo</b> .....                                                                                                                                                    | 72 |

## Introdução

Como resultado da crescente eutrofização sofrida pelos corpos d'água, tanto no Brasil como em vários outros países, é cada vez mais comum a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas. No Brasil, o primeiro relato de intoxicação humana provavelmente relacionado com uma floração de cianobactérias foi feito por Teixeira *et al.* (1993) para o reservatório de Itaparica, Bahia, com a morte de 88 pessoas dentre 2000 intoxicadas. Mais recentemente, como resultado da Síndrome de Caruaru, 52 mortes foram atribuídas à exposição intravenosa de microcistinas (Azevedo *et al.* 2002), sendo o primeiro caso realmente comprovado de intoxicação humana por cianotoxinas. Dada a importância das cianobactérias nos reservatórios de abastecimento, através da Portaria nº. 1469 de 29 de Dezembro de 2000, o Ministro da Saúde tornou obrigatório o monitoramento de cianobactérias e suas toxinas nos reservatórios de abastecimento. Porém, em 26 de Março de 2004, essa portaria foi revogada através da Portaria nº. 518 e foi estipulado o prazo de um ano para que os órgãos competentes se regularizassem no intuito de tornar possível o cumprimento do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas.

Um dos gêneros mais comuns associado às florações de cianobactérias é *Microcystis*, sendo *M. aeruginosa* (Kützinger) Kützinger a espécie mais encontrada nas florações tóxicas (Carmichael 1996). O gênero, geneticamente delimitado baseado em seqüências do gene RNAr 16S (Komárek & Komárková 2002, Komárek 2003a), é caracterizado por colônias compostas por células esféricas com aerótopos distribuídas irregularmente em envelope mucilaginoso, sendo descritas cerca de 25 espécies planctônicas ao redor do mundo (Komárek 2003b). Watanabe (1996), estudando amostras de cultivo, identificou 5 espécies de *Microcystis* para o Japão: *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* Kützinger, *M. novacekii* (Komárek) Compère, *M. viridis* (A. Braun in Rabenhorst) Lemmermann e *M. wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondratieva. De acordo com Komárek (2003b), já foram descritas para a América do Norte as espécies *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner ex Forti, *M. ichthyoblabe*, *M. natans* Lemmermann ex Skuja, *M. smithii* Komárek et Anagnostidis, *M. viridis* e *M. wesenbergii*. Dentre as espécies citadas para o Brasil, temos *M. aeruginosa*, *M. botrys* Teiling, *M.*

*wesenbergii* (Sant'Anna & Azevedo 2000), *M. novacekii*, *M. protocystis* Crow, *M. flos-aquae* e *M. pseudofilamentosa* Crow (Sandes 1998).

Komárek (1991), estudando populações e cepas de *Microcystis* provenientes de lagos do Japão, referiu-se à taxonomia do gênero como pouco conhecida e à difícil caracterização das espécies, além disso citou que táxons poderiam ter sido incorretamente identificados como *M. aeruginosa*, gerando maior número de citações dessa espécie pelo mundo. Nesse mesmo trabalho o autor apresentou como causas dos erros de identificação a existência de vários morfotipos e a ocorrência de populações em diferentes estágios de desenvolvimento em regiões distantes. A delimitação dos morfotipos é de difícil realização, principalmente quando analisando material da natureza, pois estágios de desenvolvimento de diferentes espécies podem apresentar características semelhantes. Portanto, é particularmente problemático reconhecer, naquelas cianobactérias com ciclo de vida complexo, como no caso de *Microcystis*, se essas variações observadas pertencem a diferentes espécies e, até mesmo gêneros, ou são estágios de desenvolvimento de uma única espécie (Komárek & Anagnostidis 1999).

Nota-se que é cada vez mais comum a utilização da análise de caracteres reprodutivos, de desenvolvimento e ciclo de vida em cepas mantidas em condições controladas de cultivo como ferramenta à taxonomia de cianobactérias com o objetivo de solucionar problemas taxonômicos (Bittencourt-Oliveira 2000, Komárek *et al.* 2002, Honda & Azevedo 2004). Os caracteres fenotípicos obtidos a partir destes estudos são uma das fontes de informações para uma abordagem taxonômica multidisciplinar ou taxonomia polifásica (Gillis *et al.* 2001). A complementaridade dos estudos de populações naturais e cepas na caracterização dos táxons de cianobactérias, e a utilização de informações da morfologia, biologia, fisiologia, bioquímica, ecologia etc. na melhor determinação das espécies foi discutida por Anagnostidis & Komárek (1985). Zehnder (1985) também citou que os estudos em cultura são indispensáveis para a solução de problemas taxonômicos de cianobactérias, desde que baseados em cepas identificadas corretamente.

Assim, no Brasil, alguns trabalhos utilizaram estudos em cultura na taxonomia de cianobactérias. O primeiro foi o de Oliveira (1976) que estudou espécies de cianobactérias heterocitadas do estado do Rio de Janeiro em amostras da natureza e cultura. Para o Estado de São Paulo, as primeiras referências na utilização de cultivos na taxonomia do grupo

foram Oliveira (1978) e Oliveira *et al.* (1980). Oliveira (1978) fez o levantamento das cianobactérias, exceto as da Ordem Chroococcales, da região de São José do Rio Preto e Mirassol e noticiou a ocorrência de 14 espécies, das quais apenas três espécies heterocitadas foram estudadas em cultura. Oliveira *et al.* (1980) utilizaram meio de cultura isento de nitrogênio para o isolamento de cianobactérias heterocitadas presentes em solos de plantação de arroz e milho no Município de Piracicaba. As cianobactérias isoladas e identificadas em nível genérico foram: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Hapalosiphon*, *Microchaete* e *Nostoc*. No Brasil, os trabalhos de cunho taxonômico realizados em condições de cultura que consideraram, na circunscrição de espécies, as características morfológicas, reprodutivas e de desenvolvimento são poucos e restritos ao Estado de São Paulo. O primeiro trabalho realizado conforme esta abordagem é o de Bicudo (1985) para a cianobactéria *Borzia trilocularis* Cohn *ex* Gomont, coletada e isolada de um lago artificial no Jardim Botânico de São Paulo. O autor partiu da premissa de ser *Borzia* um bom gênero ou o hormogônio de uma outra Oscillatoriales. Assim, através do acompanhamento do desenvolvimento e reprodução, estabeleceu o ciclo de vida e comprovou tratar-se de um gênero com características estáveis e bem definidas. Entretanto, os trabalhos de biosistemática de cianobactérias tomaram impulso a partir da década de 90 com os trabalhos de Azevedo (1991), Azevedo & Kovácik (1996), Azevedo & Sant'Anna (1994, 1999), Komárek & Azevedo (2000) e, mais recentemente, Azevedo *et al.* (2003), Azevedo & Sant'Anna (2003) e Honda & Azevedo (2004). Azevedo (1991) inventariou 24 táxons estudando material isolado de solo de área do Jardim Botânico de São Paulo. Azevedo & Kovácik (1996) propuseram uma nova espécie de cianobactéria, *Rhabdogloea brasílica*, cuja circunscrição foi feita a partir de material subaéreo proveniente da natureza e do estudo da variabilidade morfométrica, reprodução e desenvolvimento de cultivos em experimento de gradiente-cruzado de irradiância e temperatura. Azevedo & Sant'Anna (1994) propuseram nova espécie de cianobactéria edáfica, *Hormothece geitleriana*, através de estudos morfológicos e de desenvolvimento de material em cultura. Analisando os caracteres ambientais e os de reprodução, desenvolvimento e morfométricos observados em cepas isoladas de um lago eutrófico do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), Azevedo & Sant'Anna (1999) propuseram uma nova espécie de *Coelosphaerium*, *C. evidenter-marginatum*. Komárek & Azevedo

(2000), utilizando cepas (SPC57 e SPC221) isoladas do Lago das Garças (PEFI), propuseram a combinação nova *Geitlerinema unigranulatum*. Neste trabalho, além do estudo do material em cultivo, o material da natureza foi analisado, assim como aspectos ecológicos e ultraestruturais foram também abordados. Recentemente, espécies novas como *Eucapsis densa* (Azevedo *et al.* 2003) e *Sphaerocavum brasiliense* (Azevedo & Sant'Anna 2003) foram propostas baseadas também em análises de material em cultivo. A cultura foi também uma boa ferramenta para o conhecimento das cianobactérias de um reservatório oligotrófico, Lago do IAG, localizado no PEFI (Honda & Azevedo 2004).

Especificamente para o gênero *Microcystis*, muitos trabalhos taxonômicos envolvendo cultura discutiram a validade das morfoespécies e seus problemas de identificação. Um dos primeiros trabalhos foi o de Doers & Parker (1988) que questionava se as morfoespécies *M. aeruginosa* e *M. flos-aquae* representavam táxons separados. Concluíram que sim pois essas morfoespécies diferiram morfológicamente (nas mesmas condições de cultivo) quanto ao tamanho celular, pigmentação, morfologia colonial em meio sólido, espessura do envelope mucilaginoso, distância entre as células e forma da margem do envelope mucilaginoso. Através de análises morfológicas e do padrão eletroforético de aloenzimas, Kato *et al.* (1991) mostraram que *M. viridis* e *M. wesenbergii* são espécies bem definidas. Otsuka *et al.* (1999), com o objetivo de caracterizar as morfoespécies do gênero *Microcystis*, utilizaram, além de caracteres morfológicos, caracteres genéticos e fisiológicos em suas análises de 24 cepas isoladas de lagos do Japão pertencentes às espécies *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis* e *M. wesenbergii*. Os parâmetros analisados foram: tamanho celular; temperatura ótima de crescimento; tolerância à salinidade; quimioheterotrofia e fotoheterotrofia; composição guanina/citosina; composição de ácidos graxos e análise de PCR-RFLP. Concluíram que as características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas das cepas estudadas não elucidaram diferenças entre as morfoespécies e possivelmente uma espécie com vários tipos de colônias (morfotipos) poderia ter sido classificada em diferentes espécies. Eles enfatizaram também a necessidade da utilização do maior número de cepas possível nos estudos das espécies de *Microcystis*. Otsuka *et al.* (2000), analisando a variabilidade morfológica das colônias de *Microcystis* em cultura das mesmas morfoespécies do trabalho anterior, porém de cepas diferentes isoladas da China, Japão, Tailândia e Reino Unido,



concluíram que a classificação do gênero baseada apenas nas características morfológicas é questionável. Finalmente, Otsuka *et al.* (2001), com base em experimentos de associação DNA-DNA afirmaram que as cinco morfoespécies de *Microcystis* possivelmente integrariam uma única espécie, *M. aeruginosa*.

No Brasil, a situação problemática da taxonomia de *Microcystis* não difere daquela relatada acima. Bittencourt-Oliveira *et al.* (2001) estudaram a variabilidade morfológica e genética com base no sequenciamento do gene da ficocianina (*cpc BA*) em 15 cepas brasileiras de *Microcystis aeruginosa* e concluíram que não há correspondência entre as morfoespécies (M1 - M6) e as seqüências genotípicas (G1 - G9). Por outro lado, através da análise de variação morfológica, ciclo de vida e estrutura celular de populações naturais e material em cultivo, Komárek *et al.* (2002) verificaram a estabilidade fenotípica e propuseram uma espécie nova, *M. panniformis*, para o Brasil. Essa nova espécie e *M. protocystis*, ambas encontradas em corpos d'água eutrofizados, provavelmente possuam distribuição pantropical. Recentemente, *M. panniformis* teve sua identidade validada através de análises morfológicas e moleculares (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2005). Verifica-se, portanto, através das conclusões contraditórias sobre a taxonomia de *Microcystis*, tanto para o Brasil quanto para outros países, que são extremamente necessários mais estudos para caracterizar essas morfoespécies. Isso principalmente em relação ao material tropical e subtropical cujas diferentes espécies ainda não foram conhecidas profundamente. Além disso, outro aspecto importante na problemática identificação dessas morfoespécies, ou de outras cianobactérias, decorre da utilização de floras de áreas temperadas, como a de Geitler (1932). Ao se tentar identificar "a qualquer custo", com freqüência foram negligenciadas diferenças morfológicas, métricas e biológicas, além dos dados ecológicos que, segundo Komárek & Anagnostidis (1999), são fundamentais na caracterização das espécies de cianobactérias.

Mundialmente, na última década, tem havido um incremento no número de cepas de cianobactérias isoladas com fins de estudos de biologia molecular e toxicidade. Tal tendência está também ocorrendo no Brasil. Entretanto, como discutido por Willmote & Herdman (2001) são necessários cuidados preliminares ao se trabalhar com relações filogenéticas entre as cianobactérias. Entre estes cuidados está a caracterização morfológica das cepas e sua identificação correta que podem comprometer a interpretação de árvores

filogenéticas baseadas na sequência do 16S rRNA. Segundo Komárek (2003b), apesar da cultura ser extremamente importante na taxonomia de cianobactérias, a identificação das cepas é negligenciada e mais de 50% das cepas em coleções tem identificação incorreta. Isso pode estar ligado à própria variação do material em cultura (Otsuka *et al.* 2000) ou à contaminação (mistura) da cepa durante manutenção do laboratório (Janse *et al.* 2003). Além disso, alguns táxons podem ser facilmente confundidos devido à morfologia semelhante. Por exemplo, como ocorre entre *Microcystis panniformis* e *Sphaerocavum brasiliense* (Azevedo & Sant'Anna 2003), e *Microcystis botrys* e *Radiocystis fernandoi* (Vieira *et al.* 2003), espécies planctônicas com aerótopos e presentes em corpos d'água eutrofizados.

Assim, considerando os escassos estudos sobre o ciclo de vida de espécies brasileiras do gênero *Microcystis* e as diferenças morfológicas (Komárek *et al.* 2002) e filogenéticas (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001) existentes entre cepas de países temperados e tropicais, o presente projeto objetivou os estudos taxonômicos e de desenvolvimento “in vitro” de cepas de *Microcystis* através de material isolado de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Além disso, o melhor conhecimento das características fenotípicas (morfológicas) das morfoespécies de *Microcystis* está de acordo com a taxonomia polifásica (Vandamme *et al.* 1996) e subsidiará estudos futuros (ecológicos, fisiológicos, moleculares etc) através do uso de cepas identificadas corretamente.

## Objetivos

- estudar a variabilidade morfométrica de *Microcystis* spp. em condições controladas de cultivo e natureza;
- conhecer a estabilidade dos caracteres morfológicos diacríticos utilizados na taxonomia dessas morfoespécies em diferentes irradiâncias e temperaturas;
- comparar as morfoespécies, melhor caracterizar e diferenciar esses táxons.

## Material e métodos

### 1. Cepas estudadas e condições de cultura

As cepas estudadas foram isoladas de diferentes corpos d'água do Estado de São Paulo, no período de 1997 a 2001 (Tabela 1), e são mantidas em condições não axênicas no Banco de Culturas de Algas (SPC) do laboratório “Marilza Cordeiro-Marino”, Seção de Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo.

Tabela 1. Morfoespécies de *Microcystis* mantidas no Banco de Culturas de Algas da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica (SPC), número das cepas, data de coleta, local de coleta no estado de São Paulo e principal utilização do corpo d'água.

| Morfoespécie           | Cepa   | Data     | Local                                  | Utilização                |
|------------------------|--------|----------|----------------------------------------|---------------------------|
| <i>M. aeruginosa</i>   | SPC522 | 26.02.98 | Reservatório de Americana, Americana   | recreacional              |
|                        | SPC805 | 14.02.01 | Termas de Ibirá, São José do Rio Preto | recreacional              |
|                        | SPC833 | 01.08.01 | Reservatório Billings, São Paulo       | abastecimento             |
| <i>M. panniformis</i>  | SPC503 | 03.09.97 | Reservatório Billings, São Paulo       | abastecimento             |
|                        | SPC686 | 07.10.99 | Lago das Garças (PEFI*), São Paulo     | paisagístico              |
|                        | SPC702 | 19.10.99 | Lago das Garças (PEFI), São Paulo      | paisagístico              |
|                        | SPC827 | 13.09.01 | Pesqueiro 05, Mairiporã                | piscicultura              |
| <i>M. wessenbergii</i> | SPC771 | 26.01.00 | Lago de Peixes, Ribeirão Preto         | piscicultura (ornamental) |
|                        | SPC774 | 26.01.00 | Lago de Peixes, Ribeirão Preto         | piscicultura (ornamental) |
|                        | SPC855 | 13.09.01 | Pesqueiro 04, Mairiporã                | piscicultura              |

\* Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

As técnicas de isolamento e repicagem utilizadas foram descritas por Stein (1973), sendo o meio de cultura utilizado na manutenção das cepas o ASM-1 modificado por Zagatto & Aragão (1992), Tabela 2. Outras condições empregadas na manutenção do banco de culturas foram: fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro, temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiância  $20\text{--}25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A irradiância sempre foi mensurada utilizando medidor de quanta Li-COR (modelo LI-250) com sensor plano Li-COR (modelo LI-190).

Tabela 2. Composição do meio ASM-1 (Gorham *et al.* 1964 *apud* Rippka 1988) e comparação com os meios modificados por Zagatto & Aragão (1992), Molica (1996) e Reynolds & Jaworski (1978).

| componente                                                      | ASM-1<br>(Gorham <i>et al.</i> 1964,<br><i>apud</i> Rippka 1988) | ASM-1 modificado<br>(Zagatto & Aragão<br>1992) | ASM-1 modificado<br>(Molica 1996) | ASM-1 modificado<br>(Reynolds & Jaworski<br>1978) |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>macronutriente (mM)</b>                                      |                                                                  |                                                |                                   |                                                   |
| NaNO <sub>3</sub>                                               | 2,00                                                             | 2,00                                           | 2,00                              | 2,00                                              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                 | 0,10                                                             | -                                              | -                                 | -                                                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                 | -                                                                | 0,128                                          | 0,128                             | 0,128                                             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                | 0,10                                                             | 0,10                                           | 0,10                              | 0,10                                              |
| MgSO <sub>4</sub>                                               | 0,20                                                             | 0,20                                           | 0,20                              | 0,20                                              |
| MgCl <sub>2</sub>                                               | 0,20                                                             | 0,20                                           | 0,20                              | 0,20                                              |
| CaCl <sub>2</sub>                                               | 0,20                                                             | 0,20                                           | 0,20                              | 0,20                                              |
| EDTA Na <sub>2</sub>                                            | 0,020                                                            | 0,020                                          | 0,020                             | 0,021                                             |
| FeCl <sub>3</sub>                                               | 0,004                                                            | 0,004                                          | 0,004                             | 0,025                                             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> | -                                                                | -                                              | -                                 | 0,00081                                           |
| <b>elemento traço (mM)</b>                                      |                                                                  |                                                |                                   |                                                   |
| B                                                               | 40                                                               | 40                                             | 40                                | 40                                                |
| Mn                                                              | 7,0                                                              | 7,0                                            | 7,0                               | 7,0                                               |
| Zn                                                              | 3,2                                                              | 2,5                                            | 2,2                               | -                                                 |
| Co                                                              | 0,08                                                             | 0,08                                           | 0,08                              | -                                                 |
| Cu                                                              | 0,0008                                                           | 0,008                                          | 0,014                             | -                                                 |

## 2. Determinação das curvas de crescimento nas condições de manutenção do banco de culturas

Foram determinadas três curvas de crescimento referentes às cepas *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771. A curva de crescimento foi feita em triplicata (Erlenmeyer de 1000 mL com 500 mL de meio mais 50 mL de inóculo – cerca de  $10^5$  -  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) nas seguintes condições: meio de cultivo ASM-1; pH=7,4; temperatura  $20 \pm 1$  °C; irradiância 25  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; fotoperíodo de 14 h de claro por 10 h de escuro e sem aeração/agitação. Para determinação dessas curvas foram realizadas contagens do número de células diariamente em câmara de Fuchs-Rosenthal. Para o rompimento das colônias foi utilizado NaOH 1 M na proporção 2:1 (1000  $\mu\text{L}$  cultivo: 500  $\mu\text{L}$  NaOH 1 M) e banho-maria a 60 °C, segundo Molica (1996). Como modificação, o banho-maria foi prolongado de 10 para 20 min para a cepa SPC771 devido ao envelope mucilaginoso mais firme. Após determinação da curva de crescimento, foram calculados a taxa de crescimento ( $\mu$ ; dia<sup>-1</sup>) e o tempo de duplicação (G; dia<sup>-1</sup>), segundo as fórmulas apresentadas por Fogg (1975):

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) \cdot (t - t_0) \quad G = (\ln 2) \cdot \mu^{-1}$$

$N_0$  – número inicial de célula.mL<sup>-1</sup> no tempo inicial  $t_0$

$N$  - número final de célula.mL<sup>-1</sup> no tempo  $t$

Outro parâmetro apresentado foi o rendimento celular ( $R$ ; célula.mL<sup>-1</sup>) que representa a concentração máxima de células durante a curva de crescimento. Com esses dados foi possível padronizar a fase para análise das características morfométricas (diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso) e de crescimento (taxas de crescimento).

### **3. Análise da variabilidade morfométrica de *Microcystis* spp. nas condições de manutenção do banco de culturas e natureza**

Foram analisadas os seguintes parâmetros para descrição e caracterização de *Microcystis* spp.: forma da colônia, diâmetro celular ( $n=50$ ), espessura ( $n=50$ ) e textura do envelope mucilaginoso, organização e distribuição das células na colônia e tipo de fragmentação da colônia. As características morfométricas como diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso foram analisadas por volta do início da fase estacionária de crescimento, período estipulado após determinação da curva de crescimento segundo item 2. Para as cepas SPC771 e SPC774 de *Microcystis wesenbergii* (Tabela 1), a espessura do envelope mucilaginoso referiu-se à camada mucosa externa ao envelope refringente/firme e foi denominado envelope mucilaginoso externo difluente. Sempre que possível, o material da natureza que serviu de fonte de inóculo da cepa foi estudado e comparado com o material em cultura. Caso contrário, outras amostras da natureza, i.e., que não representam a fonte de inóculo da cepa, foram utilizadas como comparação com o material isolado (Tabela 3). Quanto à origem das amostras da natureza, uma única amostra não pertencente a São Paulo foi utilizada: Praia do Conde, Barcarena – Pará. Todas as amostras da natureza foram depositadas no herbário “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” do Instituto de Botânica (SP).

Tabela 3. Amostras da natureza utilizadas nas análises morfométricas de *Microcystis* spp. com localização, data de coleta e número de herbário.

| Localização                                      | Data     | número de herbário (SP) |
|--------------------------------------------------|----------|-------------------------|
| Reservatório Billings, São Paulo – SP            | 03.09.97 | 365610                  |
| Reservatório de Americana, Americana – SP        | 26.02.98 | 365611                  |
| Lago das Garças (PEFI*), São Paulo – SP          | 20.10.99 | 365612                  |
| Reservatório Billings (Pedreira), São Paulo – SP | 15.03.00 | 336046                  |
| Pesqueiro 04, Mairiporã – SP                     | 13.09.01 | 355745                  |
| Pesqueiro 07, Santana do Parnaíba – SP           | 17.09.01 | 365613                  |
| Praia do Conde, Barcarena – PA                   | ?.11.02  | 365614                  |

\* Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

Devido à complexidade morfológica de *Microcystis wesenbergii* SPC771 e SPC774, a cepa SPC771 foi submetida a um experimento adicional para estabelecer as fases de desenvolvimento dessa morfoespécie dentro do seu histórico de vida. Os objetivos foram verificar se:

- i. colônias cilíndricas com células dispostas em uma única camada formariam colônias mais complexas (tipo de análise A);
- ii. colônias esféricas, com células distantes uma das outras ou densamente arrançadas, e sem envelope mucilaginoso conspicuo representando, portanto, um tipo não característico de *M. wesenbergii*, formariam novamente colônias típicas da morfoespécie (tipo de análise B).

Para tal, o material isolado, correspondente a 1 ou mais colônias, teve sua morfologia analisada e documentada 1, 2 e 3 meses após esse isolamento. Esse material foi repicado durante o exame sempre quando apresentou crescimento (macroscópico). Para evitar perda de colônias nos tubos sem crescimento aparente (macroscópico), esses tubos foram mantidos sem repique para posterior análise. Somente no último exame todos os tubos foram submetidos à análise microscópica. Os parâmetros analisados foram: forma da colônia, espessura e textura do envelope mucilaginoso, organização e distribuição das células na colônia e tipo de fragmentação.

O sistema de classificação adotado foi o de Anagnostidis & Komárek (1985). Para as Chroococcales foi utilizado o trabalho de Komárek & Anagnostidis (1999) com as mais recentes modificações para o grupo.

#### **4. Experimento em cultura: variação de irradiância e temperatura (gradiente-cruzado)**

As cepas *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 (Tabela 1) foram utilizadas no gradiente-cruzado.

##### **4.1. Produção de biomassa**

Cerca de 500 ml de inóculo ( $10^5 - 10^6$  célula.ml<sup>-1</sup>) foi utilizado para realização do experimento. Inicialmente foram inoculados 5 ml de material denso ( $10^5 - 10^6$  célula.ml<sup>-1</sup>) em 50 ml de meio ASM-1 e incubados até aumento da biomassa. Após isso, esse material foi transferido para um Erlenmeyer com 500 ml de meio ASM-1, até a obtenção de biomassa suficiente para realização do experimento. O inóculo transferido correspondeu a 10% do volume final de meio de cultivo e esteve em fase exponencial de crescimento, de acordo com o item 2.

##### **4.2. Gradiente-cruzado de irradiância e temperatura**

Foram inoculados 6 mL de cultivo denso (cerca de  $10^5 - 10^6$  célula.ml<sup>-1</sup>) em frascos de 100 mL de capacidade autoclavados com 60 mL de meio de cultura ASM-1. Foram utilizadas 20 combinações de luz e temperatura, sendo os frascos numerados e distribuídos conforme a tabela 4. Para cada combinação foram mantidos frascos em quadruplicata totalizando 80 frascos. Antes de submeter os frascos ao gradiente-cruzado, para cada condição de irradiância e temperatura, 1 mL de três frascos foi coletado, submetido à digestão do envelope mucilaginoso (vide item 2) e preservado em solução final de formalina 4% para posterior contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal. Os experimentos foram realizados em câmaras incubadoras com fotoperíodo de 14 h de luz por 10 h de escuro e finalizados ao início da fase estacionária de crescimento de acordo com as curvas de crescimento obtidas nas condições controladas (vide item 2). O mesmo procedimento de coleta (1 mL), dissolução de envelope mucilaginoso e preservação do material foi utilizado para determinação do n°. final de célula.mL<sup>-1</sup>, utilizando os mesmos frascos da determinação do número inicial de célula.mL<sup>-1</sup>. O quarto frasco de cada combinação experimental foi preservado em formalina 4% e submetido às análises morfométricas.



Tabela 4. Condições de irradiância e temperatura do gradiente-cruzado com a distribuição dos 80 frascos.

| Tempertura<br>(°C) | Irradiância (mmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) |               |               |               |               |
|--------------------|------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                    | 2,56 ± 0,375 <sup>§</sup>                                  | 13,89 ± 0,906 | 27,62 ± 2,115 | 43,16 ± 3,650 | 55,52 ± 3,129 |
| 15±1               | 1-4 <sup>  </sup>                                          | 5-8           | 9-12          | 13-16         | 17-20         |
| 20±1               | 21-24                                                      | 25-28         | 29-32         | 33-36         | 37-40         |
| 25±1               | 41-44                                                      | 45-48         | 49-52         | 53-56         | 57-60         |
| 30±1               | 61-64                                                      | 65-68         | 69-72         | 73-76         | 77-80         |

\* valores apresentados como média ± desvio padrão (n=8)

<sup>||</sup> os números em itálico referem-se aos frascos utilizados para a análise morfológica

#### 4.3. Análise do crescimento de *Microcystis* spp. no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura

A análise do crescimento em cada condição de irradiância e temperatura foi feita de acordo com fórmula apresentada no item 2 para determinação da taxa de crescimento ( $\mu$ ; dia<sup>-1</sup>). Para tal foram utilizados n°. célula.mL<sup>-1</sup> no início do experimento, ou seja, após a inoculação do material, e o n°. célula.mL<sup>-1</sup> ao fim do experimento. Os dados foram apresentados como valores médios (n=3) mais o desvio padrão.

#### 4.4. Análise da estabilidade morfométrica de *Microcystis* spp. no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura

Para análise das características taxonômicas foram utilizados cerca de 60mL de material preservado em formalina 4% proveniente de cada tratamento. Para as cepas *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 foram analisados: morfologia colonial, diâmetro celular (n=50), espessura (n=50) e textura do envelope mucilaginoso.

#### 5. Proposição do ciclo de vida de *Microcystis* spp.

O esquema do ciclo de vida foi resultado da análise conjunta do material em cultura, nas condições controladas e no gradiente-cruzado, e da natureza.

#### 6. Análise estatística dos dados

O programa utilizado foi o “Statistica” (versão 5.0). Para comparação das médias de diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso entre material de cultura e natureza foi utilizado o teste-t para amostras independentes, módulo “Basic Statistics/Tables”. Para saber se houve significância das variáveis irradiância e temperatura sobre os parâmetros

taxa de crescimento, diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso foi feita análise de variância bifatorial, módulo “Anova/Manova”.

## Resultados e discussão

### 1. Curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 nas condições de manutenção do banco de culturas

Com o objetivo de padronizar a fase para análise das características morfométricas (diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso) e de crescimento (taxas de crescimento), foram realizadas três curvas de crescimento referentes às morfoespécies *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 (Figura 1). Além disso, outros parâmetros como tempo de duplicação e rendimento celular foram apresentados na Tabela 5.

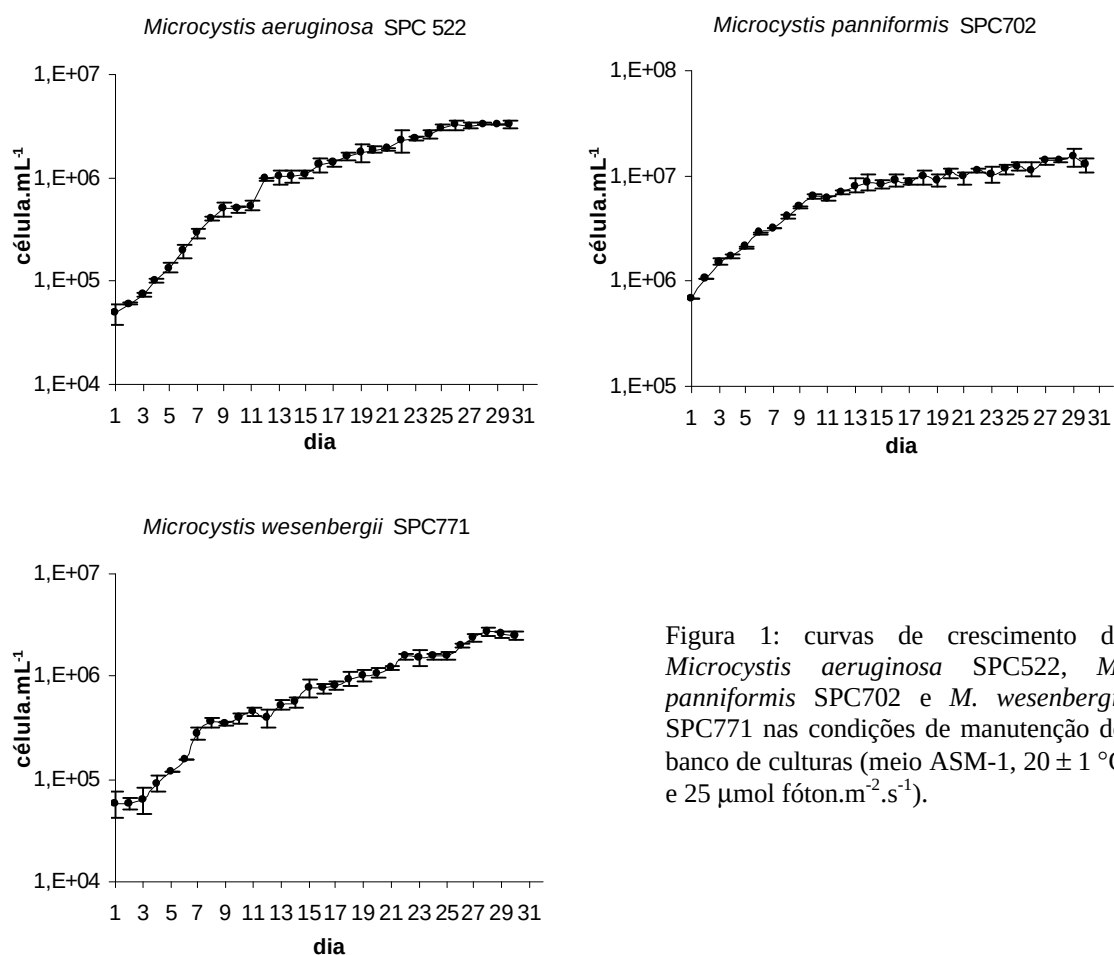


Figura 1: curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 nas condições de manutenção do banco de culturas (meio ASM-1,  $20 \pm 1$  °C e  $25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

De acordo com a Tabela 5, o término da fase exponencial de crescimento das morfoespécies *Microcystis aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771 ocorreu entre os dias 8 e 10. Com isso, o fim do experimento de gradiente-cruzado foi padronizado para ocorrer ao término da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária, ou seja, por volta do dia 10 nas condições controle de manutenção das cepas. Pode-se perceber que a cepa *M. wesenbergii* SPC771, quando comparada às cepas SPC522 e SPC702, apesar de apresentar uma maior taxa de crescimento ( $\mu=0,3452 \text{ dia}^{-1}$ ) e menor tempo de duplicação ( $G=2,0079 \text{ dia}^{-1}$ ), não apresentou grande diferença para o período de fim da fase exponencial, que ocorreu por volta do dia 8. Em relação ao rendimento celular máximo, o maior valor foi  $R = 1,28.10^7 \text{ célula.mL}^{-1}$  (Tabela 5) para a cepa SPC702.

Tabela 5. Fases exponencial e estacionária de crescimento de morfoespécies de *Microcystis* ( $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), taxa de crescimento, tempo de duplicação e rendimento celular.

| Morfoespécie (cepa)            | Fase exponencial (dia) | Fase estacionária (último dia) | Taxa de crescimento ( $\mu$ ; $\text{dia}^{-1}$ ) | Tempo de duplicação ( $G$ ; $\text{dia}^{-1}$ ) | Rendimento celular no 31º dia ( $R$ ; $\text{célula.mL}^{-1}$ ) |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>M. aeruginosa</i> (SPC522)  | 1-8                    | ?                              | 0,3030                                            | 2,2879                                          | $3,32.10^6$                                                     |
| <i>M. panniformis</i> (SPC702) | 1-10                   | 35                             | 0,2465                                            | 2,8124                                          | $1,28.10^7$                                                     |
| <i>M. wesenbergii</i> (SPC771) | 3-8                    | ?                              | 0,3452                                            | 2,0079                                          | $2,75.10^6$                                                     |

## 2. Análises morfométricas e de desenvolvimento de *Microcystis* spp. em cultivo e natureza

### 2.1. *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846

#### 2.1.1. Variabilidade morfométrica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; $23 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; $20\text{-}25 \text{ mmol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e natureza

*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, Tabulae Phycologicae oder Abbildungen der Tange I.

Figuras 02-15, Tabela 6.

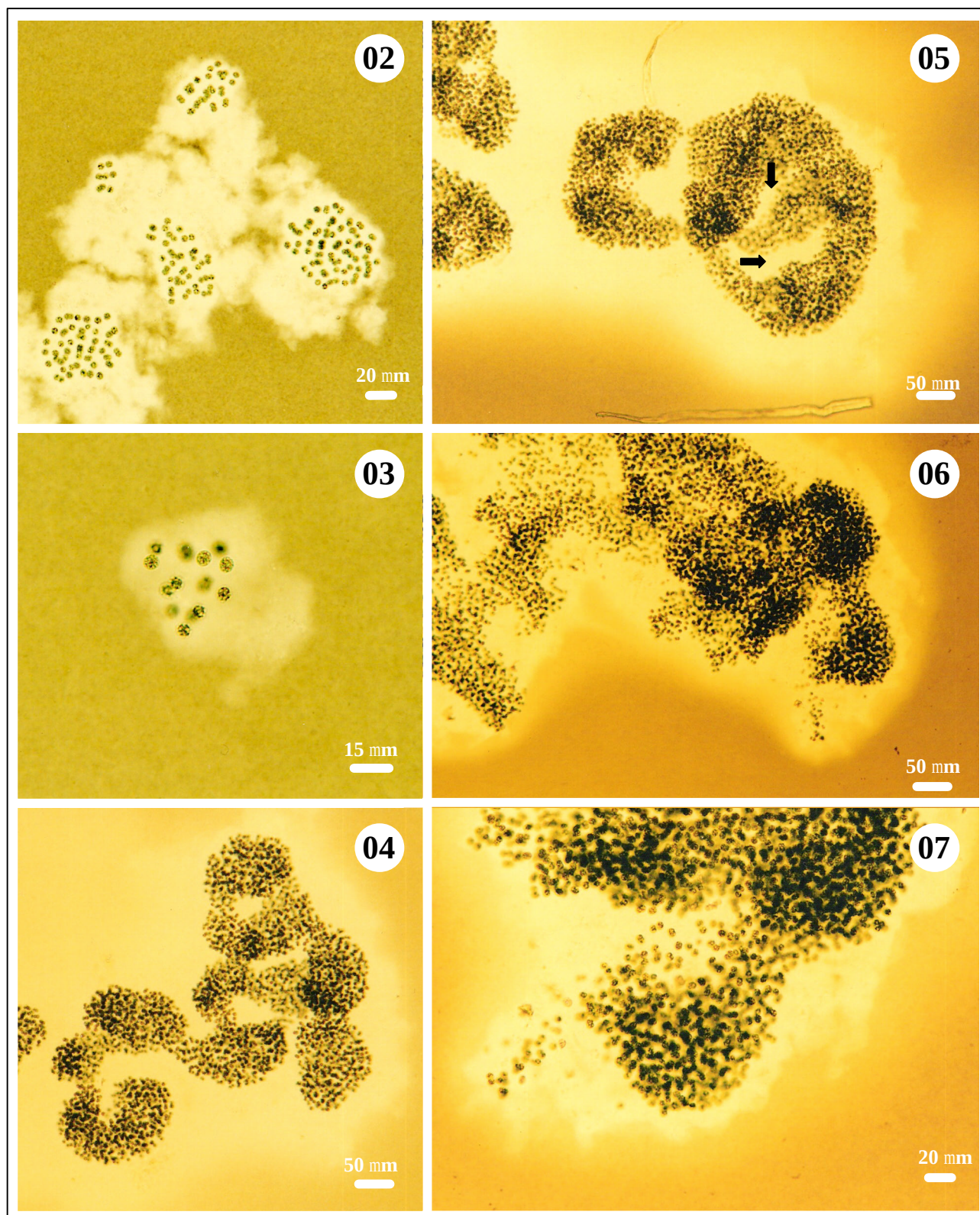
Colônias jovens esféricas/oblongas, posteriormente lobadas a irregulares, às vezes clatradas; envelope mucilaginoso amplo, raro estreito, com espessura média  $5,8 - 29,7 \mu\text{m}$  (mín.  $0,0$ ; máx.  $76,8 \mu\text{m}$ ) ( $n=50$ ), incolor, inconspícuo, difluente, homogêneo; células densamente e irregularmente distribuídas; células esféricas ou levemente alongadas antes da divisão, diâmetro médio entre  $5,4 - 6,3 \mu\text{m}$  (mín.  $4,3$ ; máx.  $7,2 \mu\text{m}$ )

(n=50); conteúdo celular acastanhado, com aerótopos. Fragmentação da colônia por desprendimento de colônias-filhas ou por dissolução da mucilagem colonial.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Reservatório Billings, 03-IX-1997, *C.L. Sant'Anna* (SP365610); Americana, Reservatório de Americana, 26-II-1998, *P.A.C. Senna* (SP365611). Cepas SPC522, SPC805, SPC833.

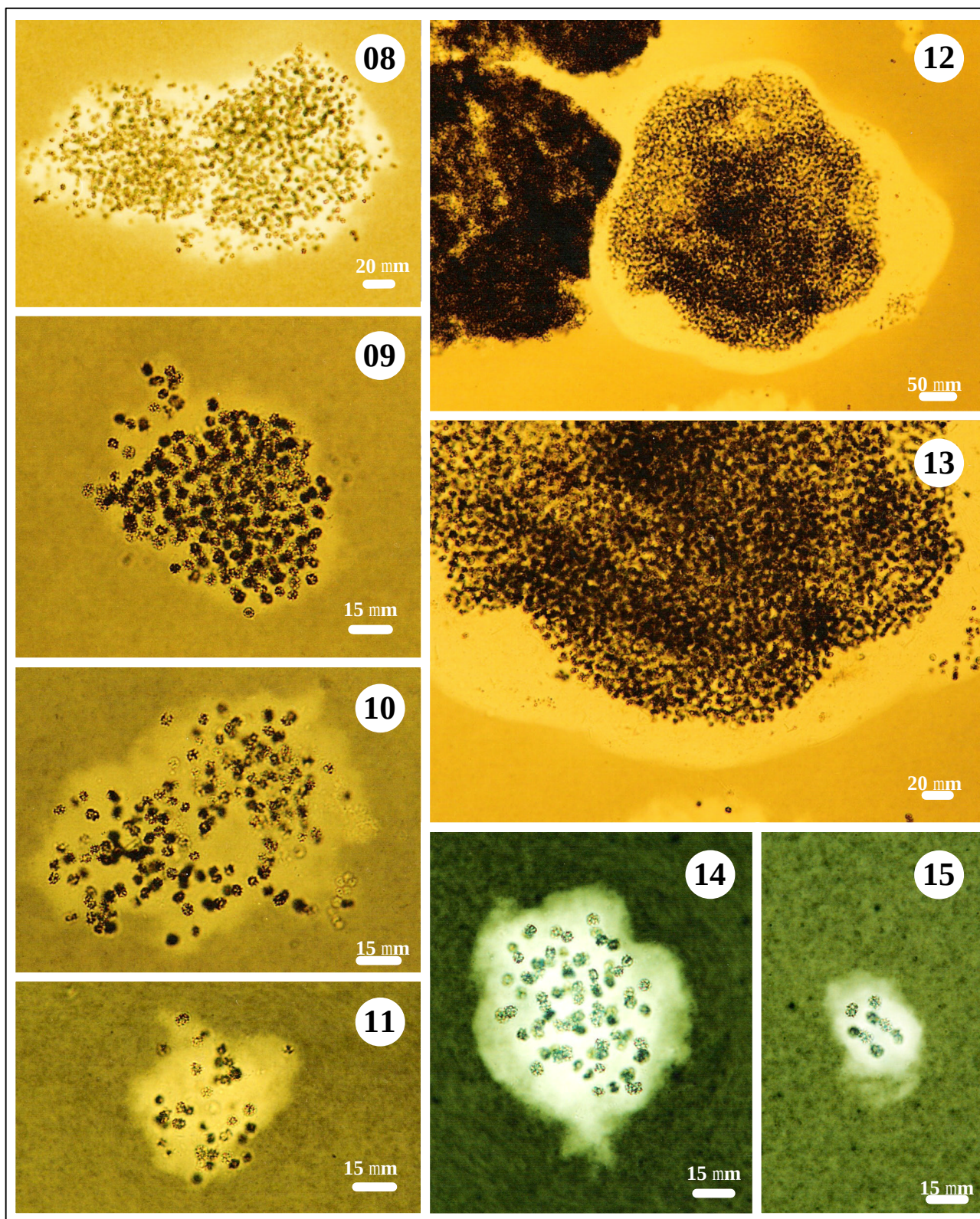
A cepa SPC522, isolada do Reservatório de Americana, SP, apresentou colônias menos densas (Figuras 02-03) e envelope mucilaginoso difluente mais estreito quando comparadas às colônias das cepas SPC805 isolada das Termas de Ibirá, SP (Figuras 04-05) e SPC833 isolada do Reservatório Billings (Figuras 06-07). Além da diferença na densidade celular, as colônias na cepa SPC522 apresentaram-se geralmente esféricas, enquanto que para as outras duas cepas, elas foram lobadas, irregulares e clatradas (Figuras 04-07).

Na natureza, a morfologia colonial de *Microcystis aeruginosa* foi um pouco diferente daquela encontrada na cultura, principalmente em relação à forma da colônia e, em menor grau, à espessura do envelope mucilaginoso. Na fonte de inóculo da cepa SPC522 (amostra de Americana), foram vistas colônias geralmente irregulares, densas (Figuras 08-09) ou com poucas células, com envelope mucilaginoso difluente (Figuras 10-11). Para as cepas SPC805 e SPC833 (Figuras 04-07), ocorreram colônias lobadas e irregulares densas semelhantes às da amostra SP365610 do Reservatório Billings (Figuras 12-13). Não houve diferença significativa ( $P=0,1255$ , Anexo - Tabela 1) para os diâmetros em cultura (SPC522),  $5,4 \pm 0,36 \mu\text{m}$ , e a amostra que serviu de inóculo para isolamento dessa cepa (Americana),  $5,5 \pm 0,34 \mu\text{m}$  (Tabela 6). Por outro lado, a espessura do envelope mucilaginoso variou entre cultura e natureza ( $P=0,0014$ , Anexo - Tabela 2). Os valores médios em cultura ( $7,8 \pm 3,47 \mu\text{m}$ ) foram maiores que os da natureza ( $5,8 \pm 2,67 \mu\text{m}$ ), Tabela 6. Além disso, na natureza foram vistas colônias com envelope mucilaginoso muito estreito ou ausente, sempre com o diâmetro celular acima de  $4,8 \mu\text{m}$  (Tabela 6), enquanto que isso não ocorreu na cultura. Portanto, enquanto que a forma das colônias, a distribuição/densidade das células e o diâmetro celular mantiveram-se constantes na cultura em comparação com o inóculo da natureza, o mesmo não ocorreu para a espessura do envelope mucilaginoso.



**Figuras 02-07: *Microcystis aeruginosa*** (meio ASM-1;  $23 \pm 1$  °C;  $15\text{-}20 \mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), com nanquim. **Figuras 02-03: SPC522.** 02. aspecto geral da col\^onia composta; 03. detalhe da col\^onia jovem pouco densa e com envelope mucilaginoso difluente amplo; **Figuras 04-05: SPC805.** 04. col\^onia adulta lobada; 05. col\^onia adulta clatrada (seta); **Figuras 06-07: SPC833.** 06. col\^onia adulta lobada; 07. detalhe da margem da col\^onia adulta lobada, notar envelope mucilaginoso amplo difluente.





**Figuras 08-11:** *Microcystis aeruginosa* Natureza - Americana (SP365611), com nanquim. 08-09. Aspecto geral da colônia com envelope mucilaginoso; 10-11. colônias pouco densas com envelope mucilaginoso amplo. **Figuras 12-13:** *M. aeruginosa* Natureza - Billings (SP365610). 12. colônia adulta com envelope mucilaginoso amplo; 13. detalhe da margem da colônia com envelope mucilaginoso amplo; **Figuras 14-15:** *M. aeruginosa* SPC522 (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  - condição controle). 14. aspecto geral da colônia adulta com envelope mucilaginoso difluente amplo; 15. colônia jovem com poucas células.

Tabela 6. Diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis aeruginosa* em cultura e natureza.

|                 | Diâmetro (mm)          | Envelope mucilaginoso (mm) |
|-----------------|------------------------|----------------------------|
| Cultura         |                        |                            |
| SPC522*         | 5,4 ± 0,36 (4,3 - 6,3) | 7,8 ± 3,47 (3,9 - 20,4)    |
| SPC805          | 6,3 ± 0,43 (5,5 - 7,2) | 16,6 ± 7,12 (5,6 - 40,3)   |
| SPC833          | 6,1 ± 0,40 (5,4 - 6,9) | 29,7 ± 15,58 (7,3 - 76,8)  |
| Natureza        |                        |                            |
| Americana - SP* | 5,5 ± 0,34 (4,8 - 6,3) | 5,8 ± 2,67 (0,0 - 11,1)    |
| Billings - SP   | 5,9 ± 0,30 (5,4 - 6,5) | 12,8 ± 8,43 (0,0 - 47,4)   |

Os valores representados são média ± desvio padrão (mínimo – máximo), n=50.

\* Cepa e material da natureza com mesma procedência.

### 2.1.2. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura

Em relação às taxas de crescimento (Figura 16, Anexo – Tabela 3), as variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo ( $F=18,71$ ;  $P=0,0000$ , Anexo – Tabela 4). A variação da taxa de crescimento foi de  $0,0321 \text{ dia}^{-1}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até  $0,6110 \text{ dia}^{-1}$  ( $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $43,16 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) – Figura 16, Anexo Tabela 3. As menores taxas de crescimento, independentemente da temperatura, foram registradas na menor irradiância,  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo sobre o diâmetro celular ( $F=13,83$ ;  $P=0,0000$ , Anexo - Tabelas 5-7) e espessura do envelope mucilaginoso ( $F=10,44$ ;  $P=0,0000$ , Anexo - Tabelas 8-10). O diâmetro celular médio variou de  $5,0 \pm 0,34 \mu\text{m}$  ( $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $27,62 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até  $5,8 \pm 0,36 \mu\text{m}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), enquanto que a espessura do envelope mucilaginoso, de  $4,9 \pm 1,43 \mu\text{m}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até  $13,5 \pm 6,01 \mu\text{m}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $27,62 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A variação para o diâmetro celular foi de  $4,2 - 6,5 \mu\text{m}$  e para a espessura do envelope mucilaginoso, de  $2,0 - 43,8 \mu\text{m}$  (Anexo – Tabelas 6 e 9), e estiveram dentro dos valores encontrados em cultura e natureza (Tabela 6).



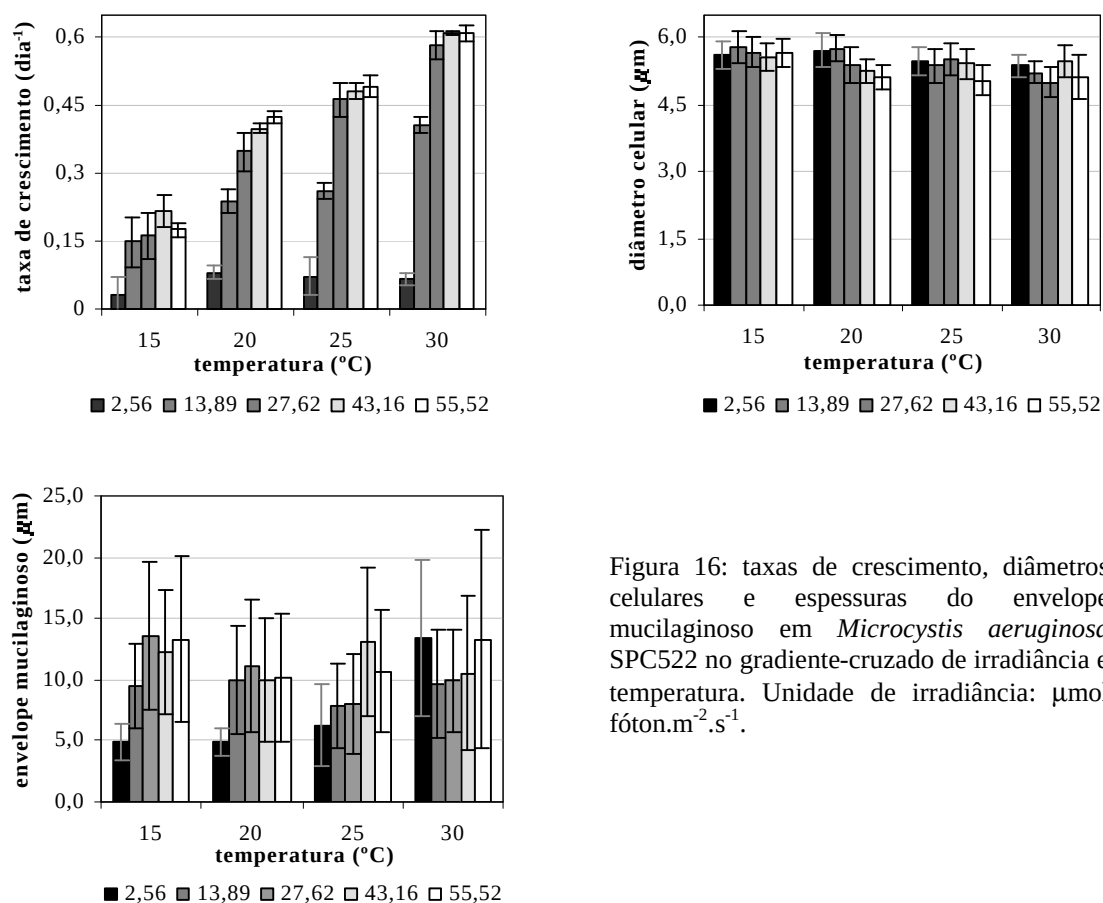
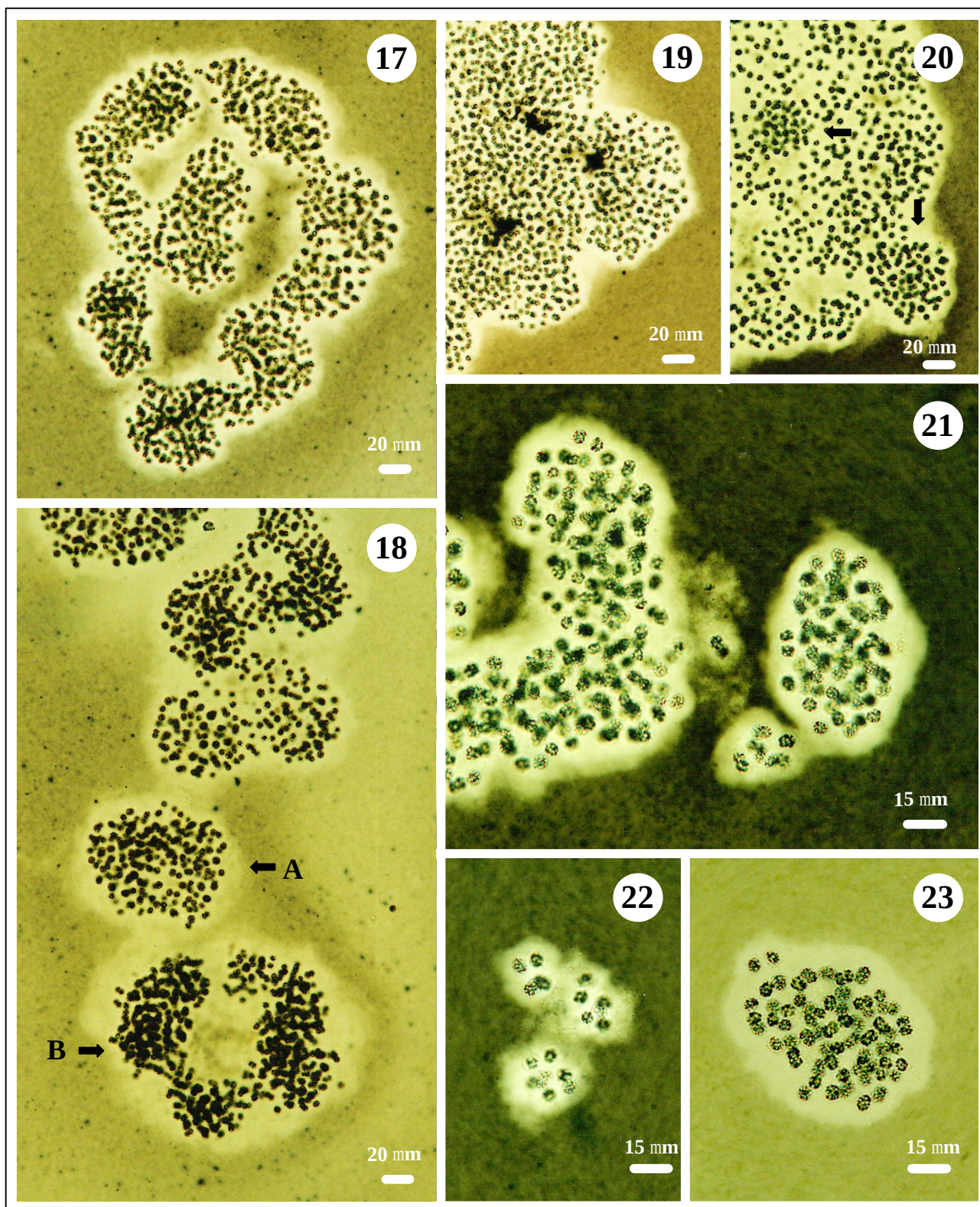


Figura 16: taxas de crescimento, diâmetros celulares e espessuras do envelope mucilaginoso em *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura. Unidade de irradiância:  $\mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### Morfologia colonial, desenvolvimento e crescimento

Foram verificadas mudanças na morfologia colonial (forma da colônia, densidade/distribuição celular e espessura do envelope mucilaginoso) no gradiente-cruzado. Na condição controle (25 °C; 13,89  $\mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\mu=0,2611 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 16, Anexo - Tabela 3) foram observadas em geral colônias esféricas, pouco densas e com células distribuídas de forma equidistante (Figuras 14-15). Nas maiores taxas de crescimento, com na condição de 30 °C e irradiância 43,16  $\mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $\mu=0,6110 \text{ dia}^{-1}$ , a variabilidade morfológica aumentou muito, apresentando formas desde esférica pouco densa até lobada mais adensada (Figuras 17-18). Ainda em condição com alta taxa de crescimento,  $\mu=0,4056 \text{ dia}^{-1}$  (30 °C; 13,89  $\mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), colônias adultas clatradas e pouco densas foram verificadas (Figuras 19-20). Já na menor taxa de crescimento,  $\mu=0,0321 \text{ dia}^{-1}$  (15 °C; 2,56  $\mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), as colônias apresentaram pouca variabilidade morfológica, como na condição controle, com predomínio de formas esféricas (Figuras 21-23). Quanto ao envelope mucilaginoso, houve variação da espessura média (Figura 16, Anexo - Tabela 8) nas diferentes



**Figuras 17-23: *Microcystis aeruginosa* SPC522** (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, meio ASM-1), com nanquim. **Figuras 17-18** ( $30 \pm 1$  °C;  $43,16 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 17. colônia lobada; 18. colônias esférica pouco densa (A) e lobada mais adensada (B); **Figuras 19-20** ( $30 \pm 1$  °C;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 19. colônia clatrada pouco densa; 20. detalhe da colônia com regiões mais adensadas (setas) devido à maior divisão celular (reprodução); **Figuras 21-23** ( $15 \pm 1$  °C;  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 21. colônias adultas, notar fragmentação de colônia-filha; 22. colônias jovens pouco densas; 23. colônia adulta com envelope mucilaginoso amplo.

condições mas, devido à grande amplitude dos valores para cada condição (Anexo – Tabela 9), foi difícil avaliar qualquer tendência em relação à espessura do envelope mucilaginoso.

### Comparação com material da natureza

A variação dos diâmetros celulares no experimento (4,2 – 6,5  $\mu\text{m}$ ) esteve próxima daquela na amostra do Reservatório de Americana (4,8 – 6,3  $\mu\text{m}$ ) e foi similar à do Reservatório Billings (5,4 – 6,5  $\mu\text{m}$ ), todas dentro da variação para *Microcystis aeruginosa* segundo Komárek & Anagnostidis (1999), Tabela 7. Por outro lado, o envelope mucilaginoso apresentou maior variação que aquela proposta para a morfoespécie. De acordo com Komárek & Anagnostidis (1999), o envelope mucilaginoso para *M. aeruginosa* varia de 5,0 – 8,0  $\mu\text{m}$ . No gradiente-cruzado ele variou de 2,0 – 43,9  $\mu\text{m}$  e na natureza, de 0,0 – 47,4  $\mu\text{m}$ .

Tabela 7. Comparação do diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis aeruginosa* na cepa SPC522 (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura: controle e todas condições), Americana (SP365611), Billings (SP365610) e segundo Komárek & Anagnostidis (1999).

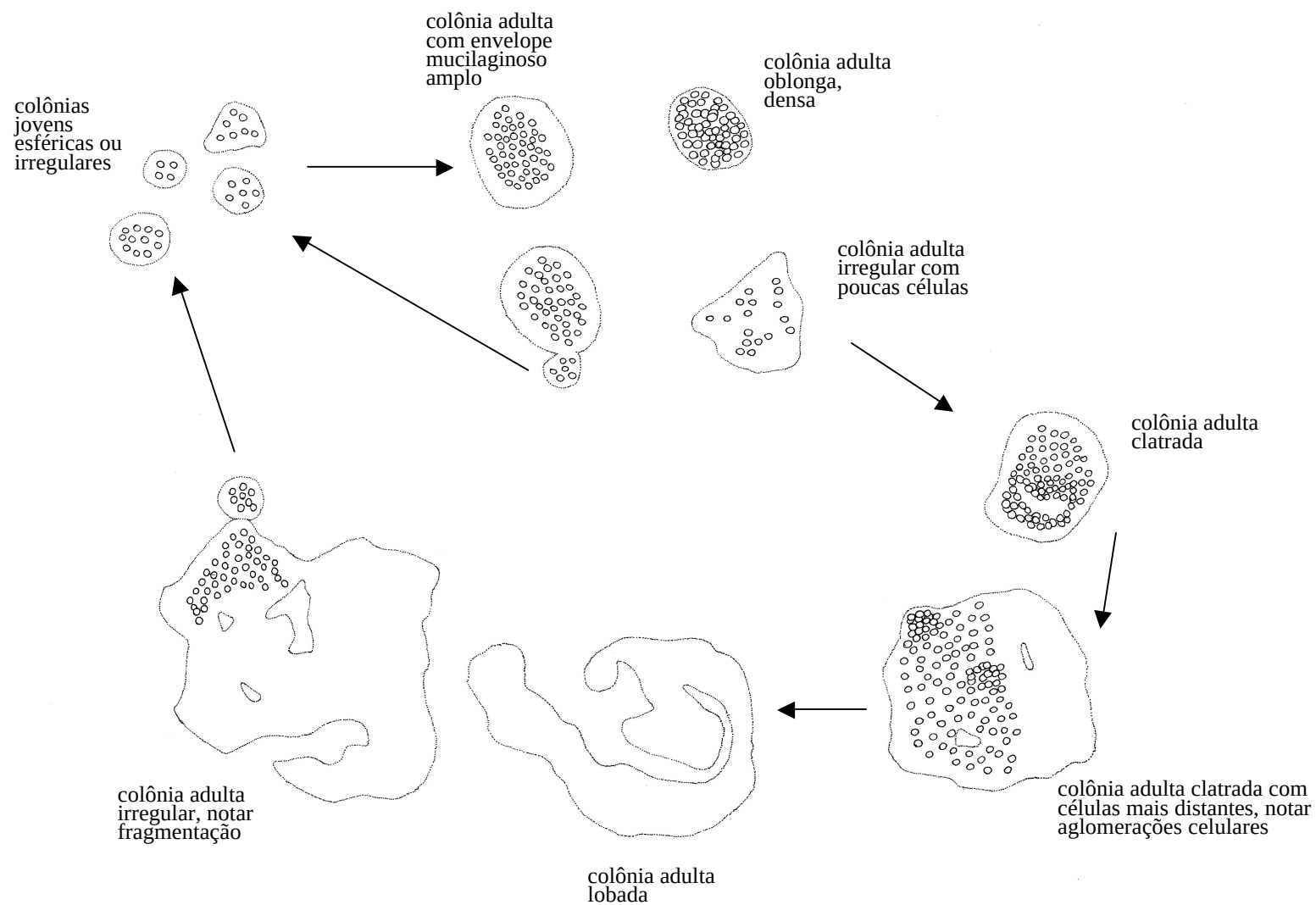
|                                                                                       | Diâmetro (mm)              | Envelope mucilaginoso (mm)   |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Controle<br>(25 °C; 13,89 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )                | 5,4 $\pm$ 0,39 (4,4 - 6,3) | 7,8 $\pm$ 3,47 (3,9 - 20,4)  |
| Todas condições<br>(15-30 °C; 2,56-55,52 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | 5,4 $\pm$ 0,41 (4,2 - 6,5) | 10,1 $\pm$ 5,70 (2,0 - 43,8) |
| Americana - SP                                                                        | 5,5 $\pm$ 0,34 (4,8 - 6,3) | 5,8 $\pm$ 2,67 (0,0 - 11,1)  |
| Billings - SP                                                                         | 5,9 $\pm$ 0,30 (5,4 - 6,5) | 12,8 $\pm$ 8,43 (0,0 - 47,4) |
| Komárek & Anagnostidis (1999)                                                         | (3,0?) 4,0 – 6,0 (9,4)*    | geralmente 5,0 – 8,0         |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão (mínimo – máximo), n=50.

\* variação mais valores raros entre parênteses

### 2.1.3. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza

De acordo com o histórico de vida de *Microcystis aeruginosa* (Figura 24), colônias esféricas ou subesféricas pouco densas originam colônias adultas irregulares, lobadas, às vezes clatradas. As colônias podem ficar mais adensadas devido à intensa multiplicação celular. A reprodução ocorre predominantemente por desprendimento de colônias-filhas ou dissolução do envelope mucilaginoso quando a colônia envelhece, liberando células que irão formar colônias jovens esféricas ou subesféricas.



**Figura 24:** Histórico de vida de *Microcystis aeruginosa*.



## 2.2. *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* 2002

### 2.2.1. Variabilidade morfolétrica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; $23 \pm 1$ °C; 20-25 mmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e natureza

*Microcystis panniformis* Komárek *et al.*, 2002, Cryptogamie Algologie 23, p. 165 (figs. 14-28)

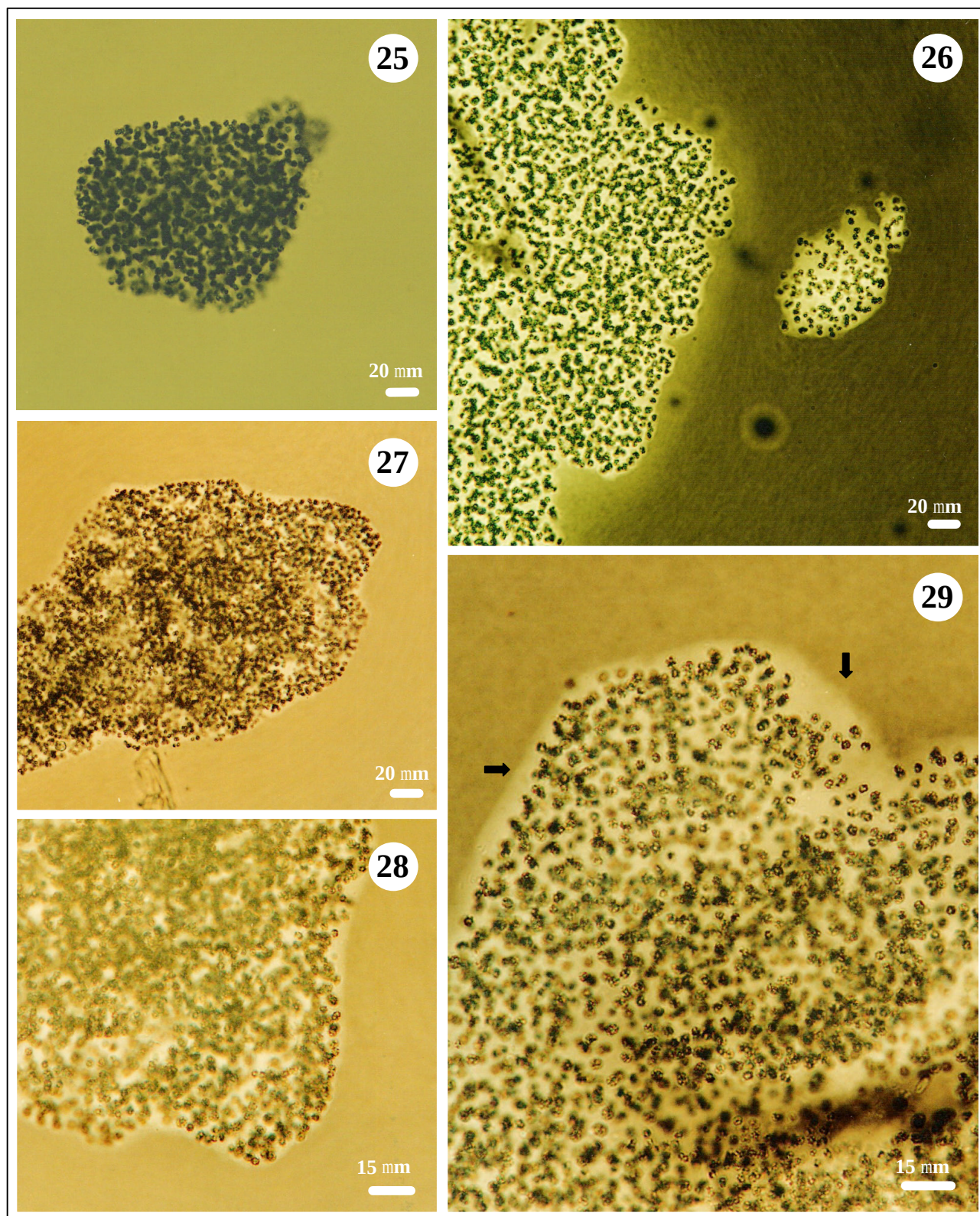
Figuras 25-34, Tabela 8.

Colônias jovens esféricas/oblongas, posteriormente irregulares; envelope mucilaginoso estreito com espessura média 1,6 - 2,3 µm (mín. 0,0; máx. 4,8 µm, levemente amplo) (n=50), incolor, inconspícuo, difluente, homogêneo; células densamente e irregularmente distribuídas; células esféricas ou levemente alongadas antes da divisão, diâmetro médio entre 3,9 - 4,2 µm (mín. 3,5; máx. 4,8 µm) (n=50); conteúdo celular acastanhado, com aerótopos. Fragmentação da colônia por desprendimento de colônias-filhas ou por dissolução da mucilagem colonial.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Reservatório Billings (Pedreira), 15-III-2000, *M.T.P. Azevedo* (SP336046); São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Lago das Garças, 20-X-1999, *D.C. Bicudo et al.* (SP365612). Cepas SPC686, SPC702, SPC827.

Atualmente, apenas as cepas SPC686 e SPC702 apresentam formas coloniais e a cepa SPC827 células isoladas ou formando aglomerados. Para a cepa SPC702, foram observadas células deformadas (anômalas) com diâmetro extremamente grande (7,2 - 9,3 µm diâm.), enquanto que o mesmo não ocorreu para as cepas SPC686 e SPC827. Essas células deformadas medindo praticamente o dobro de uma célula normal (3,5 - 4,8 µm diâm.) apareceram raramente na cepa SPC702 em boas condições morfológicas e de crescimento. Portanto, sua ocorrência aparentemente não esteve relacionada a nenhuma condição específica da cultura.

Na natureza (Figuras 27-32), ocorreram formas características da morfoespécie com envelope mucilaginoso estreito, tanto em Pedreira quanto no Lago das Garças, podendo ele ser levemente amplo (Figuras 29-30). De acordo com a Tabela 8, os diâmetros médios (4,0 - 4,1 µm) e a variação (3,5 - 4,7 µm) em cultura apresentaram próximos aos diâmetros médios (3,9 - 4,2 µm) e variação (3,5 - 4,8 µm) na natureza. A variação dos diâmetros celulares, tanto em cultura quanto na natureza, estiveram dentro dos valores propostos por Komárek *et al.* (2002), 3,0 - 4,6 µm. Quanto à espessura do



**Figuras 25-26: *Microcystis panniformis* SPC686** (meio ASM-1;  $23 \pm 1$  °C;  $15-20 \mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 25: aspecto geral da col\^onia oblonga; 26. envelope mucilaginoso estreito evidenciado por nanquim. **Figuras 27-29: *Microcystis panniformis* Natureza - Pedreira (SP336046).** 27. aspecto geral da col\^onia; 28. detalhe da margem da col\^onia com envelope mucilaginoso estreito evidenciado por nanquim; 29: detalhe da margem da col\^onia com envelope mucilaginoso levemente amplo (setas), com nanquim.

envelope mucilaginoso, sua variação em cultura (0,0 – 3,7  $\mu\text{m}$ ) esteve dentro daquela encontrada na natureza (0,0 - 4,8  $\mu\text{m}$ ). Diferença significativa foi observada quando comparados os diâmetros celulares na cepa SPC702 e na amostra que serviu de inóculo, Lago das Garças (P=0,0181, Anexo – Tabela 11). Porém, não houve diferença significativa para as espessuras do envelope mucilaginoso (P=0,1624, Anexo – Tabela 12).

Portanto, as variações dos parâmetros diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis panniformis* foram semelhantes quando analisados em condições controladas de cultivo e natureza.

Tabela 8. Diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis panniformis* em cultura e natureza.

|                      | Diâmetro (mm)              | Envelope mucilaginoso (mm) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Cultura              |                            |                            |
| SPC686               | 4,1 $\pm$ 0,23 (3,6 – 4,5) | 1,6 $\pm$ 0,86 (0,0 - 3,7) |
| SPC702 *             | 4,1 $\pm$ 0,30 (3,5 – 4,7) | 1,8 $\pm$ 0,85 (0,0 - 3,7) |
| SPC827               | 4,0 $\pm$ 0,24 (3,5 – 4,5) |                            |
| Natureza             |                            |                            |
| Pedreira - SP        | 3,9 $\pm$ 0,25 (3,5 – 4,3) | 2,3 $\pm$ 1,18 (0,0 - 4,8) |
| Lago da Garças - SP* | 4,2 $\pm$ 0,22 (3,7 – 4,8) | 1,6 $\pm$ 0,89 (0,0 - 4,0) |

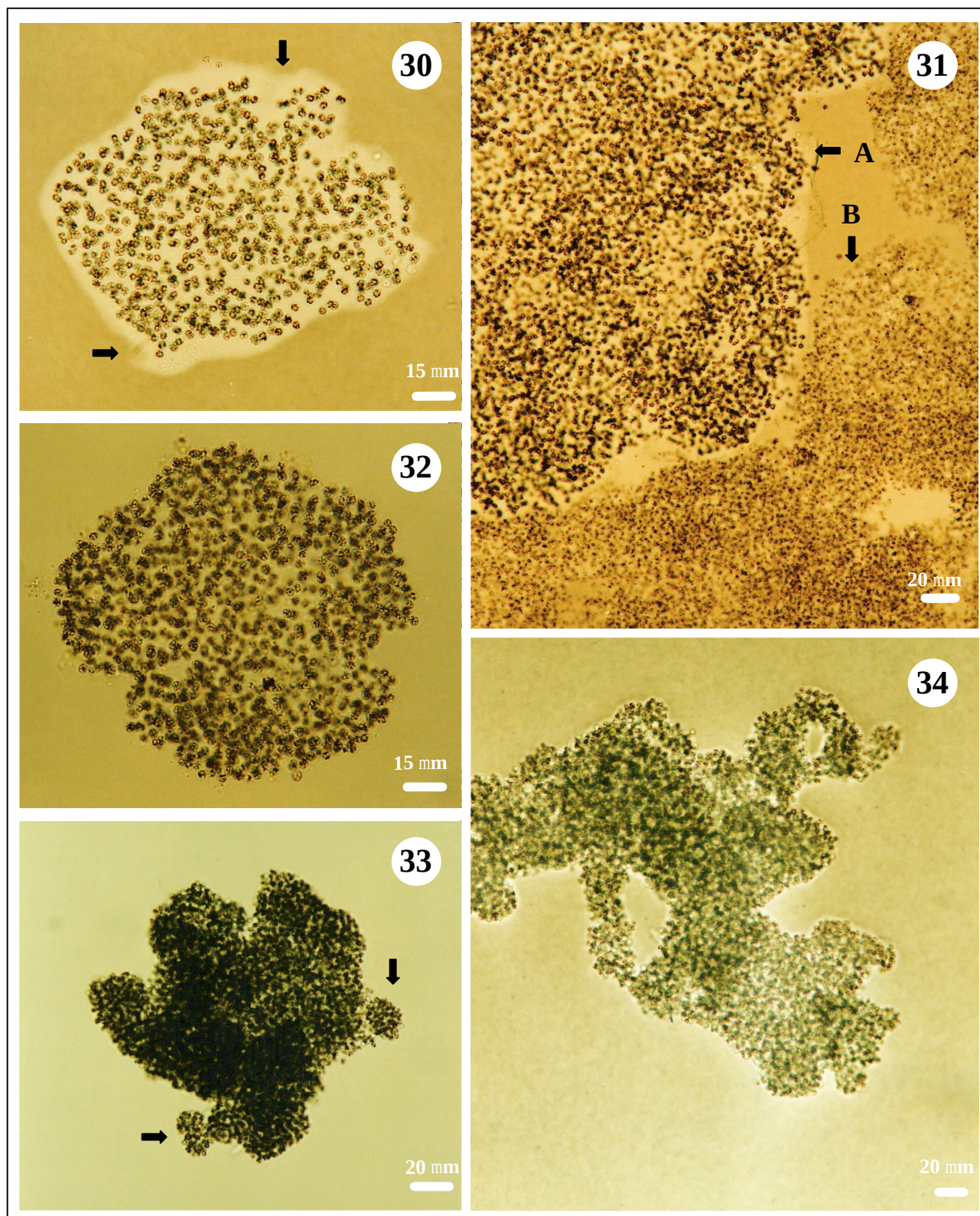
Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão (mínimo – máximo), n=50.

\* Cepa e material da natureza com mesma procedência.

### 2.2.2. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura

Em relação às taxas de crescimento (Figura 35, Anexo – Tabela 13), as variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo (F=39,12; P=0,000, Anexo – Tabela 14). A variação da taxa de crescimento foi de  $-0,0037 \text{ dia}^{-1}$  (15 °C; 13,89  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até  $0,3865 \text{ dia}^{-1}$  (30 °C; 55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) – Figura 35, Anexo - Tabela 13. As menores taxas de crescimento foram registradas na temperatura de 15 °C, variando de  $-0,0037$  a  $0,0969 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 35, Anexo - Tabela 13). Nessa baixa temperatura a cepa *Microcystis panniformis* SPC702 apresentou crescimento praticamente nulo e, provavelmente, seja sensível a essa condição. Isso está de acordo com a descrição de *M. panniformis* para regiões tropicais e subtropicais (Komárek *et al.* 2002). Houve pouca variação do diâmetro celular no gradiente-cruzado (Figura 35, Anexo - Tabelas 15-16) cujos valores médios mínimo e máximo foram  $3,9 \pm 0,28 \mu\text{m}$  (25 °C; 2,56  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e  $4,3 \pm 0,27 \mu\text{m}$  (15 °C; 55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), respectivamente. Apesar das variáveis irradiância e temperatura isoladamente





**Figuras 30-31: *Microcystis panniformis* Natureza - Pedreira (SP336046)** 30: colônia oblonga com envelope mucilaginoso levemente amplo (setas) evidenciado por nanquim; 31: massas coloniais de *M. panniformis* (A) e *Sphaerocavum brasiliense* (B). **Figura 32: *Microcystis panniformis* Natureza - Lago das Garças (SP365612):** aspecto geral da colônia. **Figuras 33-34: *Microcystis panniformis* SPC702 (meio ASM-1;  $25 \pm 1$  °C;  $13,89 \mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$  – condição controle).** 33: aspecto geral da colônia adulta com fragmentação por desprendimento de colônias esféricas (setas); 34: colônia adulta irregular clatrada com envelope mucilaginoso estreito evidenciado por nanquim.



apresentarem efeito significativo sobre o diâmetro celular (Irradiância  $F=3,43$  e  $P=0,0085$ ; Temperatura  $F=29,22$  e  $P=0,0000$ ), não houve interação entre as variáveis independentes ( $F=1,64$  e  $P=0,0760$ ), Anexo - Tabela 17. Por outro lado, a espessura do envelope mucilaginoso no gradiente-cruzado com valores médios variando de  $1,1 \pm 0,61 \mu\text{m}$  ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a  $7,2 \pm 2,98 \mu\text{m}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) teve influência direta das variáveis irradiância e temperatura ( $F=26,64$ ;  $P=0,0000$ ), Figura 35, Anexo - Tabelas 18-20.

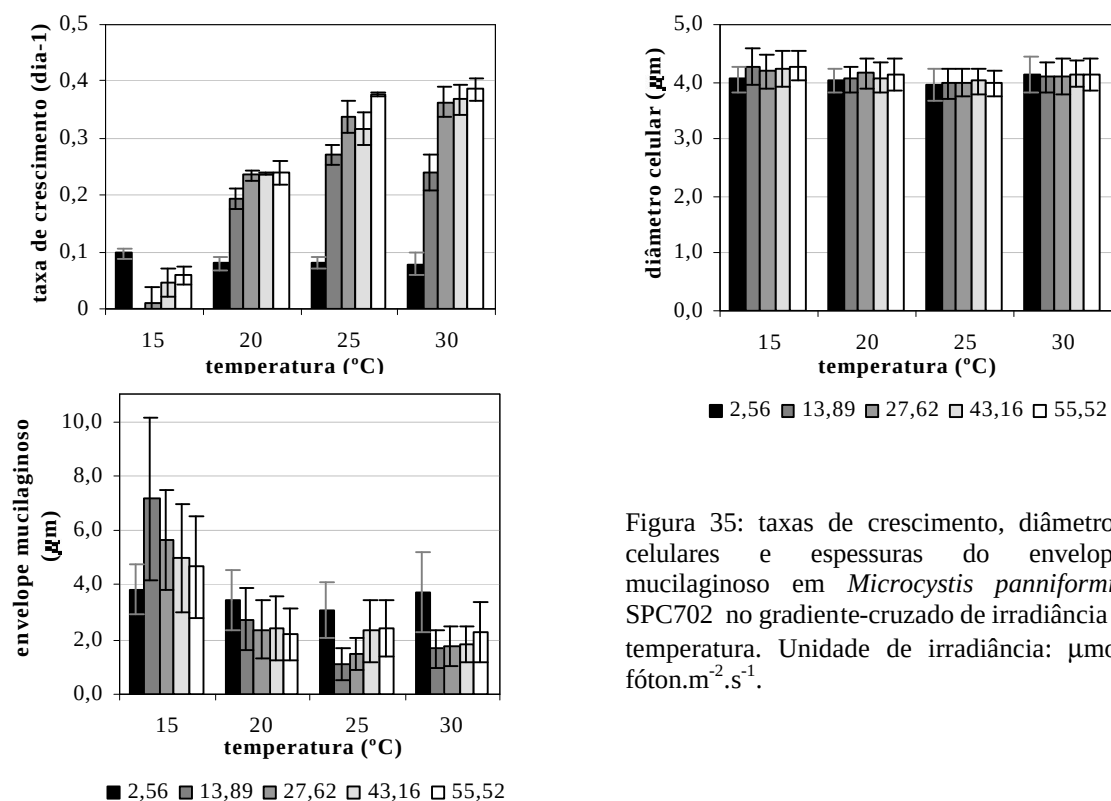


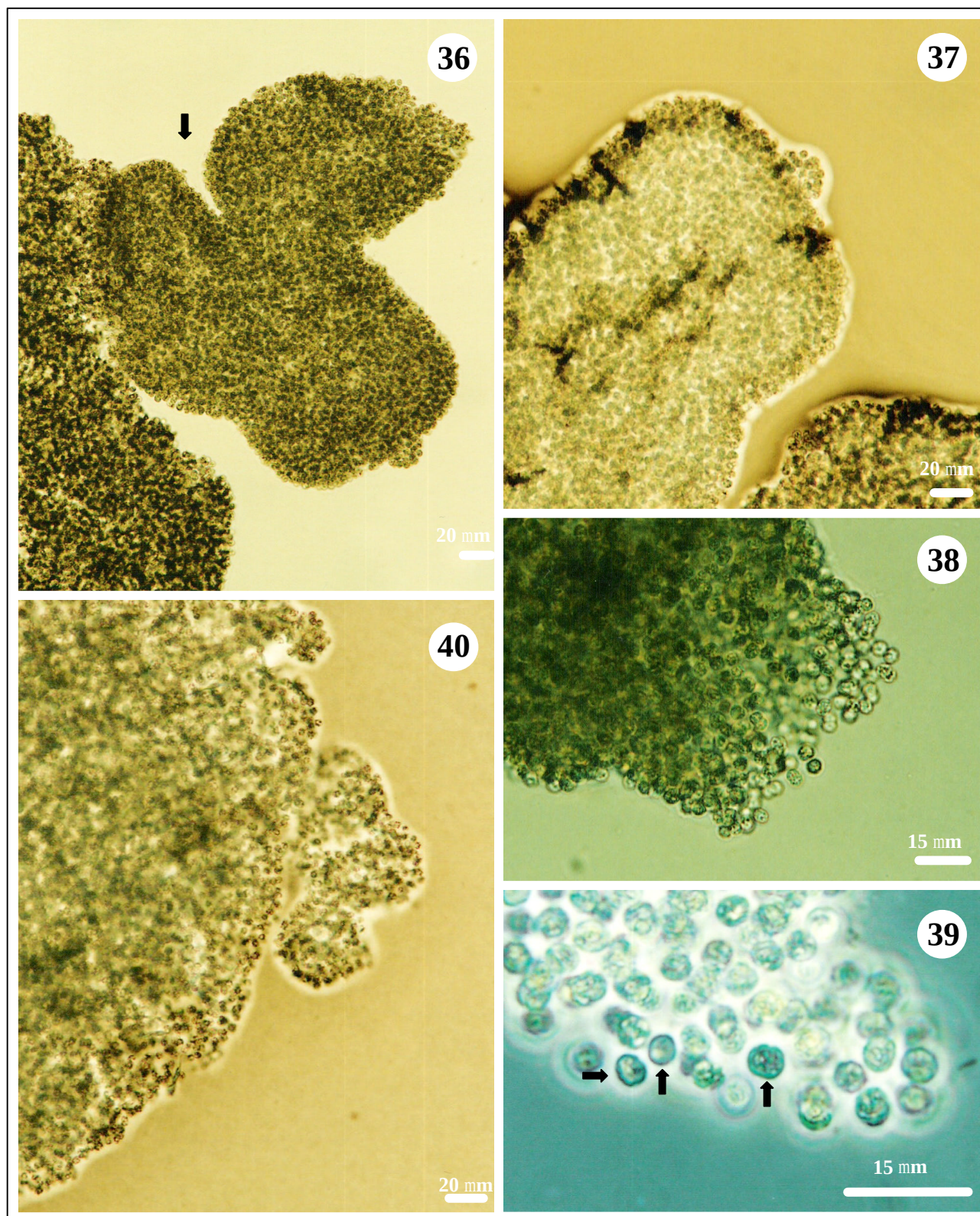
Figura 35: taxas de crescimento, diâmetros celulares e espessuras do envelope mucilaginoso em *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura. Unidade de irradiância:  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### Morfologia colonial, desenvolvimento e crescimento

Através da análise conjunta da morfologia colonial, com ênfase na distribuição das células na colônia e na espessura do envelope mucilaginoso, mais as taxas de crescimento, percebeu-se tendência de mudanças na morfologia ligadas às taxas de crescimento. Na condição controle ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $\mu=0,2710 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 35, Anexo - Tabela 13), o material apresentou-se como o material tipo de *M. panniformis* (Figuras 33-34), com colônias adultas lobadas a irregulares, às vezes clatradas como descrito por Komárek *et al.* (2002), e jovens esféricas, sempre com envelope mucilaginoso imperceptível e rente às células (Figura 34).

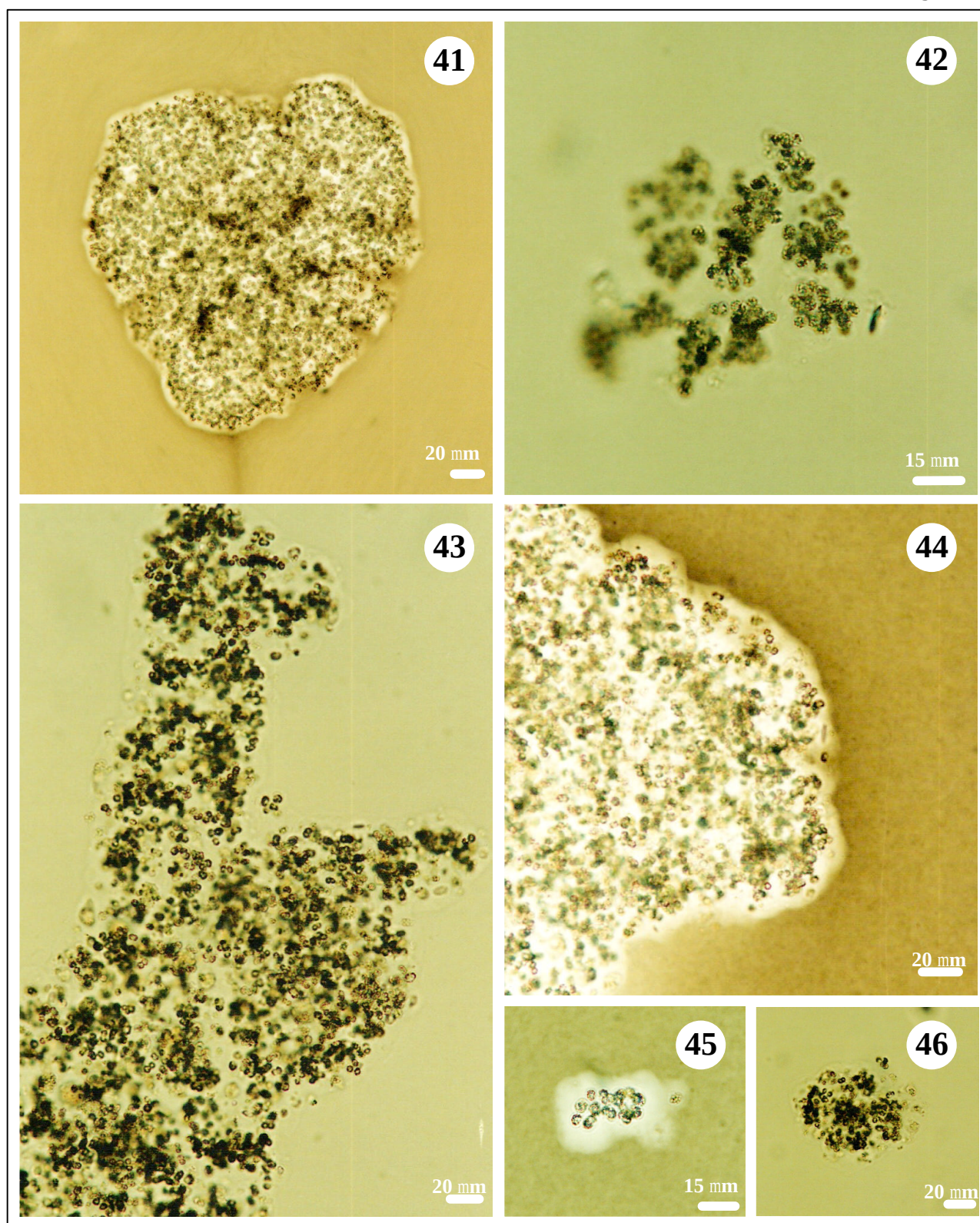
Nas maiores taxas de crescimento, condições de 30 °C e irradiâncias 27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $\mu=0,3633 - 0,3865 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 35, Anexo - Tabela 13), em algumas células ocorreu perda de aerótopos e elas apresentaram-se mais claras que nas condições citadas anteriormente, principalmente na maior taxa de crescimento registrada ( $\mu=0,3865 \text{ dia}^{-1}$ ) em todo o experimento. De acordo com as figuras 36 e 37, percebe-se que no material, em alta taxa de crescimento, colônias muito densas com aerótopos (células escuras) e sem aerótopos (células claras), 30 °C e 27,62  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A perda de aerótopos pode ser vista nas colônias mais claras, com células com coloração mais esverdeada, ao invés do acastanhado, na condição de 30 °C e 43,16  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figuras 38-39). Importante salientar que em 30 °C e 27,62  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , o envelope mucilaginoso apresentou-se de forma muito refringente e mais firme (Figura 37). Apesar do envelope mucilaginoso nessas altas taxas de crescimento ter amplitude muito semelhante ao controle (Figura 35, Anexo - Tabela 18), provavelmente a rigidez e maior refringência desse envelope esteja relacionado à essas maiores temperaturas e irradiâncias. Com menor taxa de crescimento em relação ao controle, na condição 20 °C e 43,16  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $\mu=0,2371 \text{ dia}^{-1}$ , a morfologia colonial e densidade celular estiveram semelhantes ao controle, porém o envelope mucilaginoso apresentou-se um pouco mais amplo (Figura 40).

Com a diminuição da taxa de crescimento (Figura 35, Anexo - Tabela 13), na condição de 20 °C; 2,56  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $\mu=0,0798 \text{ dia}^{-1}$ , além da forma típica de *M. panniformis* (Figura 41), porém com envelope um pouco mais amplo que o controle, foi observada uma forma colonial com células menos adensadas e aglomerações celulares bem distantes umas das outras (Figura 42). Nas menores taxas de crescimento ( $\mu=-0,0037 - 0,0466 \text{ dia}^{-1}$ ), como nas condições de 15 °C e irradiâncias entre 13,89 e 43,16  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , essas formas com aglomerações celulares e envelope mucilaginoso bem amplo (Figura 35, Anexo - Tabelas 18-19) tornaram-se mais comuns, sendo as formas típicas de *M. panniformis* raras. Já na condição de 15 °C e 55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $\mu=0,0585 \text{ dia}^{-1}$ ), Figura 35, Anexo - Tabela 13, essas colônias foram menos freqüentes e apresentaram-se com aspecto mais uniforme, i.e., mais semelhante ao controle. Essas formas atípicas, denominadas de senescentes (Figuras 43-46), estiveram associadas com condições desfavoráveis de crescimento já que na condição seguinte de maior taxa de crescimento (20 °C; 2,56  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $\mu=0,0798 \text{ dia}^{-1}$ ) - Figura 35, Anexo - Tabela 13 – elas ocorreram juntas das formas típicas de *M. panniformis* (Figura 33).



**Figuras 36-40: *Microcystis panniformis* SPC702** (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, meio ASM-1). **Figuras 36-37** ( $30 \pm 1$  °C;  $27,62 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). 36: colônias com alta densidade celular, notar colônia mais clara (seta) com perda de aerótopos; 37: envelope mucilaginoso refringente e firme, evidenciado por nanquim. **Figuras 38-39** ( $30 \pm 1$  °C;  $43,16 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). 38: detalhe da colônia com coloração esverdeada, ao invés de acastanhada, mostrando perda de aerótopos; 39: detalhe de células que perderam parte dos aerótopos (setas), contraste-de-fase. **Figura 40** ( $20 \pm 1$  °C;  $43,16 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ): aspecto geral com colônia semelhante ao controle, porém apresentando envelope mucilaginoso levemente amplo.





**Figuras 41-46: *Microcystis panniformis* SPC702** (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, meio ASM-1). **Figuras 41-42** ( $20 \pm 1$  °C;  $2,56 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). 41: colônia típica com envelope mucilaginoso levemente amplo, evidenciado por nanquim; 42: colônia pouco densa com aglomerações celulares, aspecto não senescente. **Figuras 43-46** ( $15 \pm 1$  °C;  $27,62 \mu\text{mol fóton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , formas senescentes). 43: colônia pouco densa com aglomerações celulares; 44: detalhe da margem da colônia com envelope mucilaginoso amplo evidenciado por nanquim. **Figuras 45-46:** colônias pequenas com envelope mucilaginoso amplo, provavelmente são resultado de fragmentação a partir de colônias semelhantes às das figuras 43 e 44. Notar aglomerações celulares na figura 46.

Quanto à distribuição e densidade das células, com aglomerações, essas colônias senescentes assemelham-se com as colônias de *Microcystis ichthyoblabe* (Komárek 1991).

Pode-se concluir que a distribuição/densidade celular e a espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis panniformis* estiveram associadas às taxas de crescimento em diferentes condições de irradiância e temperatura. Além disso, *M. panniformis* SPC702 foi sensível à baixa temperatura (15 °C) e, nas maiores temperaturas (25 – 30 °C) associadas às altas intensidades luminosas (44 – 55  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), houve perda de aerótopos. O diâmetro celular apresentou pouca variação e não foi influenciado pela irradiância e temperatura juntas, nas condições experimentais utilizadas.

### **Comparação com material da natureza**

As formas coloniais de *M. panniformis* encontradas no experimento foram comparadas com as da amostra da natureza Pedreira (SP336046), Figuras 27-31, e Lago das Garças (SP365612), Figura 32, assim como a descrição da espécie feita por Komárek *et al.* (2002). Na natureza (Figuras 27-32), as colônias sempre se apresentaram com células distribuídas de modo homogêneo e denso, raro formas pouco adensadas e nunca como formas senescentes com aglomerações celulares características em 15 °C (Figuras 43-46). Os diâmetros celulares médios no experimento (controle e todas as condições), em Pedreira e Lago das Garças apresentaram pequena variação, de 3,4 – 4,9  $\mu\text{m}$ , 3,5 – 4,3  $\mu\text{m}$  e 3,7 – 4,8  $\mu\text{m}$  (Tabela 9), respectivamente, quando comparada àquela descrita por Komárek *et al.* (2002), (2,5) 3,0 – 4,6 (4,8)  $\mu\text{m}$ . Quanto à espessura do envelope mucilaginoso, pôde-se perceber que o controle apresentou espessura média de  $1,1 \pm 0,61 \mu\text{m}$ , considerada estreita quando analisada em microscópio. Porém, o valor médio aumentou para  $3,1 \pm 2,01 \mu\text{m}$  quando considerada todas as condições. Isso deve-se às formas senescentes de *Microcystis panniformis* que apresentaram envelopes mucilaginosos bem mais amplos, podendo chegar até 15,7  $\mu\text{m}$ , quando submetidas à temperatura de 15 °C (Figura 35, Tabela 9). Portanto, a variação do diâmetro celular (cultura, gradiente-cruzado e amostra da natureza Pedreira) foi bem menor que aquela descrita por Komárek *et al.* (2002), nunca atingindo valores menores que 3,4  $\mu\text{m}$ . Além disso, a espessura do envelope mucilaginoso variou de estreita, como no controle 0,0 – 2,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 9) até mais ampla (6,9  $\mu\text{m}$ ), podendo chegar ao extremo de 15,7  $\mu\text{m}$  à 15 °C.

Tabela 9. Comparação do diâmetro celular e espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis panniformis* na cepa SPC702 (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura: controle, todas condições e condições acima de 15 °C), Pedreira (SP336046), Lago das Garças (SP365612) e segundo Komárek *et al.* (2002).

|                                                                                     | Diâmetro (mm)          | Envelope mucilaginoso (mm) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Controle 25°C<br>(13,89µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )                | 4,0 ± 0,27 (3,4 - 4,5) | 1,1 ± 0,61 (0,0 - 2,0)     |
| Todas condições 15-30°C<br>(2,56-55,52µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) | 4,1 ± 0,28 (3,4 - 4,9) | 3,1 ± 2,01 (0,0 - 15,7)    |
| Condições acima de 15°C<br>(2,56-55,52µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) | 4,1 ± 0,27 (3,4 - 4,8) | 2,3 ± 1,21 (0,0 - 6,9)     |
| Pedreira - SP                                                                       | 3,9 ± 0,25 (3,5 - 4,3) | 2,3 ± 1,18 (0,0 - 4,8)     |
| Lago das Garças - SP                                                                | 4,2 ± 0,22 (3,7 - 4,8) | 1,6 ± 0,89 (0,0 - 4,0)     |
| Komárek <i>et al.</i> 2002                                                          | (2,5)3,0-4,6(4,8)      | estreito                   |

### 2.2.3. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza

De acordo com o histórico de vida de *Microcystis panniformis* (Figura 47), colônias jovens esféricas originam colônias oblongas e irregulares que podem ser clatradas. A partir dessas colônias, a fragmentação ocorre geralmente por desprendimento de colônias-filhas esféricas, raro por liberação de células isoladas que irão gerar colônias jovens esféricas. Esse tipo de fragmentação ocorre nas colônias velhas através da dissolução do envelope mucilaginoso. Colônias senescentes com aglomerações celulares representam também parte do histórico de vida de *M. panniformis*, apesar de não observadas na natureza.

## 2.3. *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondrateva 1968

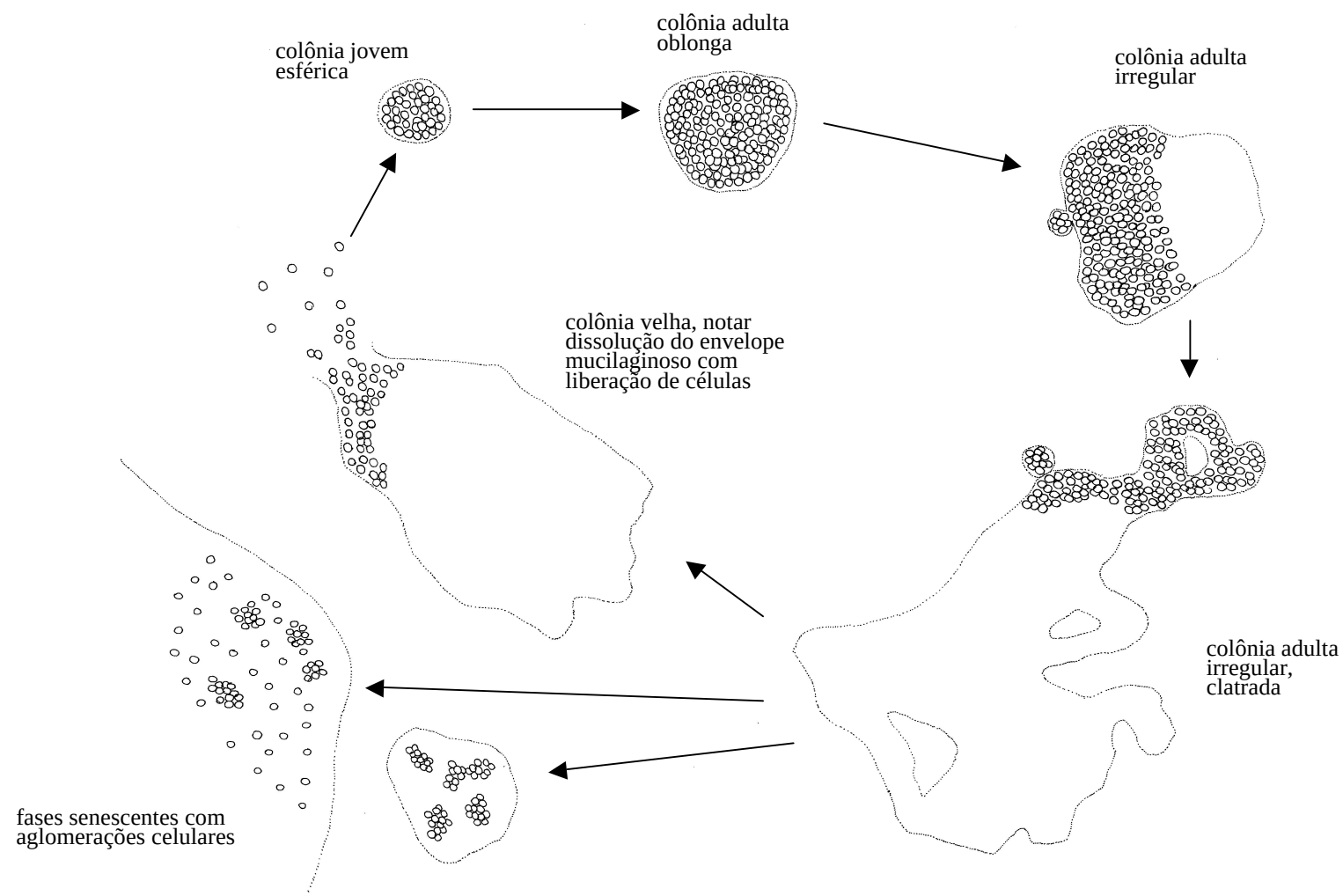
### 2.3.1. Variabilidade morfológica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1; 23 ± 1 °C; 20-25 mmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e natureza

*Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondrateva, 1968, Cvetenie vody, Naukova Dumka Kiev, p. 32

Figuras 48-89, Tabelas 10-11.

Colônias esféricas, alongadas, cilíndricas até lobadas ou reticuladas; envelope mucilaginoso incolor, conspícuo, firme, homogêneo, com margem refringente, raro apenas com envelope inconspícuo, externamente às vezes difluente e amplo (multilamelado) 7,0 ± 1,94 µm (mín. 3,3; máx. 10,8 µm) (n=50); células geralmente distribuídas na superfície da colônia; células esféricas ou levemente alongadas antes da divisão, diâmetro médio entre 4,7 – 6,7 µm (mín. 4,1; máx. 7,5 µm) (n=50); conteúdo





**Figura 47:** Histórico de vida de *Microcystis panniformis*. Fases senescentes referem-se ao presente estudo. Fases restantes, segundo Komárek *et al.* 2002.

celular acastanhado, com aerótopos. Fragmentação da colônia por desprendimento de colônias-filhas ou por dissolução da mucilagem colonial, às vezes com formação de células com envelope mucilaginoso individual firme.

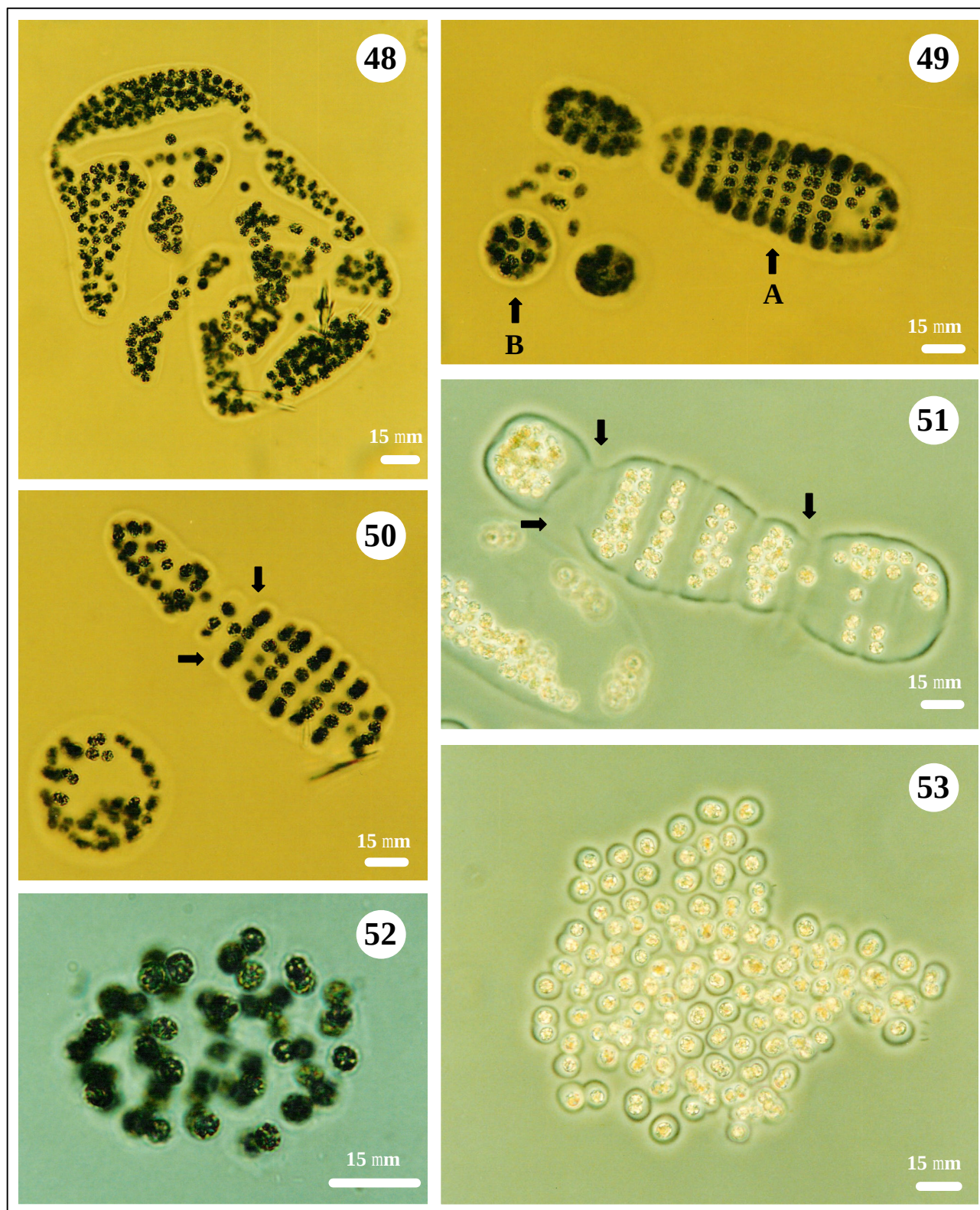
Material examinado: BRASIL. São Paulo: Mairiporã, Pesqueiro 04, 13-IX-2001, C.T.J. Mercante *et al.* (SP355745); Santana do Parnaíba, Pesqueiro 07, 17-IX-2001, C.T.J. Mercante *et al.* (SP365613); Pará: Barcarena, Praia do Conde, XI-2002, J.M.S.Vieira (SP365614). Cepas SPC771, SPC774 e SPC855.

As cepas SPC771 e SPC774 apresentaram grande variabilidade morfológica das colônias, com formas esféricas até cilíndricas e lobadas (Tabela 10, Figuras 48-66). Além disso, ocorreram formas coloniais sem envelope mucilaginoso firme e sem margem refringente nessas duas cepas (Figura 52). Quanto à cepa SPC855, a morfologia colonial esteve relacionada predominantemente às formas esféricas e lobadas (Figuras 67-72), nunca às formas alongadas como aquelas presentes nas cepas SPC771 e SPC774 (Figuras 49A, 50-51, 61-64). Além da diferença na morfologia colonial, observou-se que a cepa SPC855 difere das cepas SPC771/774 pela ausência de envelope mucilaginoso externo difluente e pelo diâmetro celular menor (Tabela 10).

Na natureza, *Microcystis wesenbergii* apresentou formas muito similares àquelas nas cepas SPC771 e SPC774, ou seja, esféricas, lobadas (Figuras 73-86) ou reticuladas, como na amostra da Praia do Conde no Pará (Figuras 87-89). Da mesma forma que na cultura (Figuras 53-54), reprodução através da fragmentação total da colônia com formação de células apresentando envelope mucilaginoso individual foi vista na natureza (Figuras 77-78). Fases provavelmente senescentes com envelope mucilaginoso firme e poucas células (Figuras 79-80, 86) foram vistas na natureza (Pesqueiros 04 e 07), enquanto que essas colônias não ocorreram na cultura. Na amostra da natureza utilizada como fonte de inóculo da cepa SPC855, foram vistas colônias esféricas com envelope mucilaginoso amplo e lamelado (Figuras 81-82). Por outro lado, em cultura, o envelope mucilaginoso externo amplo esteve associado às diferentes formas coloniais (Figuras 58-64, 66) das cepas SPC771 e SPC774.

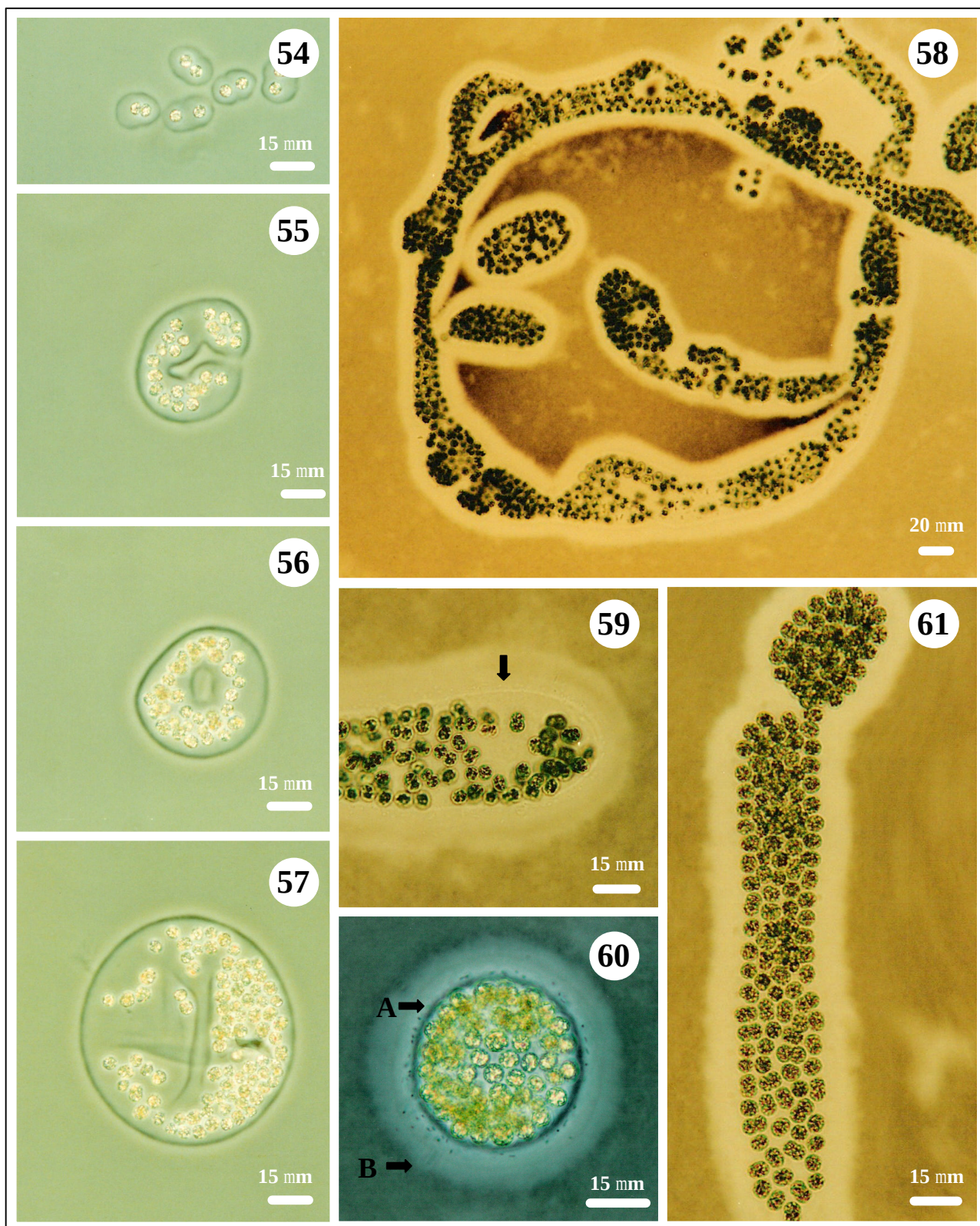
Tabela 10. Comparação entre as cepas de *Microcystis wesenbergii* (SPC771/774 e 855) quanto à morfologia colonial, estrutura do envelope mucilaginoso e variação do diâmetro celular nas condições de manutenção do banco de culturas.

|                                           | SPC771 e SPC774                         | SPC855                  |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| Morfologia colonial                       | esférica/lobada, cilíndrica, reticulada | esférica/lobada         |
| Envelope mucilaginoso firme (refringente) | presente                                | presente                |
| Envelope mucilaginoso externo difluente   | 3,3 - 10,8 $\mu\text{m}$                | ausente                 |
| Diâmetro celular                          | 5,3 – 7,5 $\mu\text{m}$                 | 3,9 – 5,8 $\mu\text{m}$ |



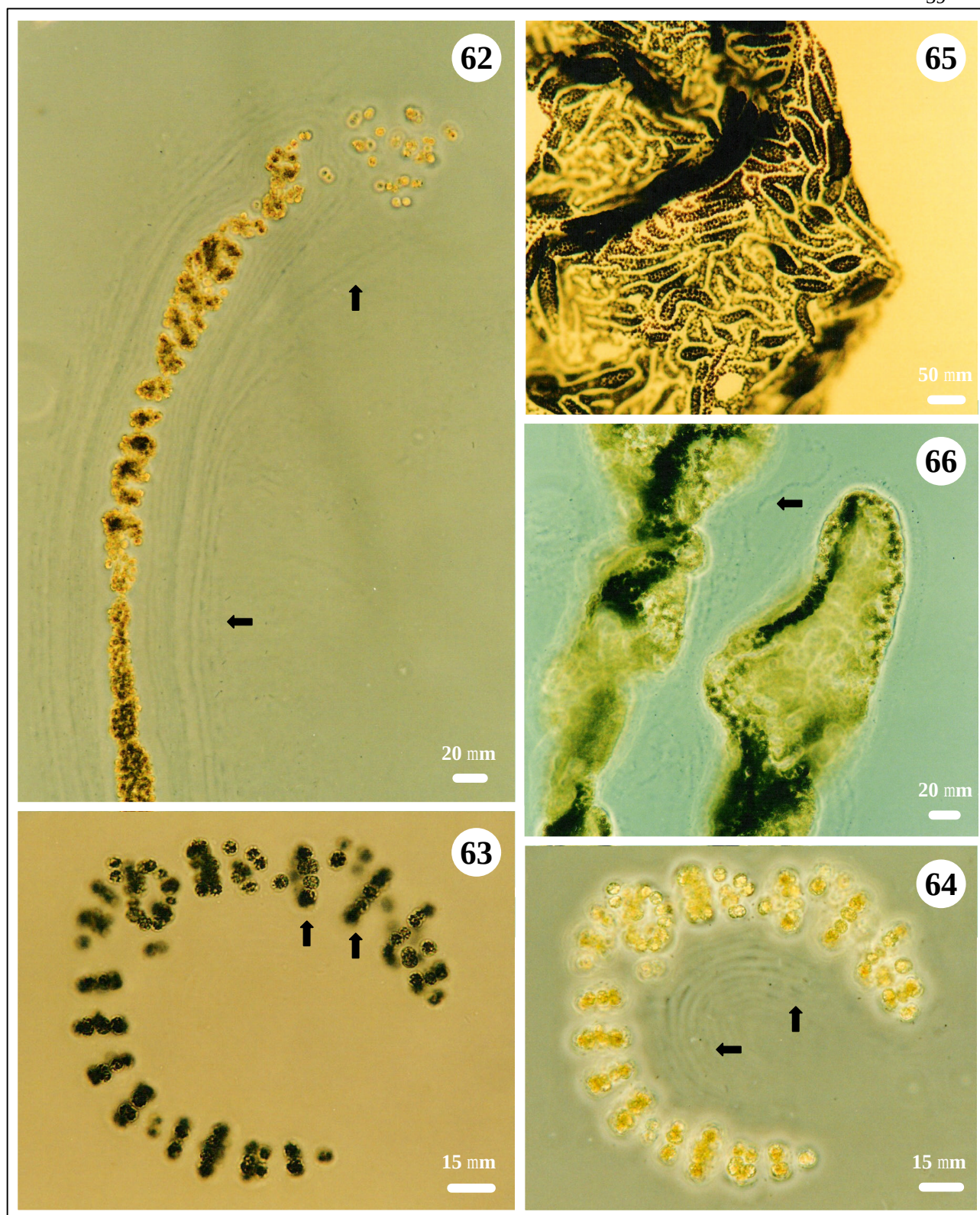
**Figuras 48-53: *Microcystis wesenbergii* SPC774** (meio ASM-1;  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $15\text{-}20 \mu\text{mol f\u00f3ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 48. forma colonial lobada; 49. col\u00f4nias cil\u00edndrica (A) e esf\u00e9rica (B), ambas com c\u00e9lulas dispostas em uma \u00fanica camada superficial; 50-51. fragmenta\u00e7\u00e3o da col\u00f4nia cil\u00edndrica com invagina\u00e7\u00e3o do envelope mucilaginoso (setas), contraste de fase (figura 51); 52. col\u00f4nia at\u00edpica com envelope mucilaginoso inconsp\u00edcuo, sem margem refringente; 53. fragmenta\u00e7\u00e3o intensa da col\u00f4nia, notar c\u00e9lulas com envelope mucilaginoso individual (contraste de fase).





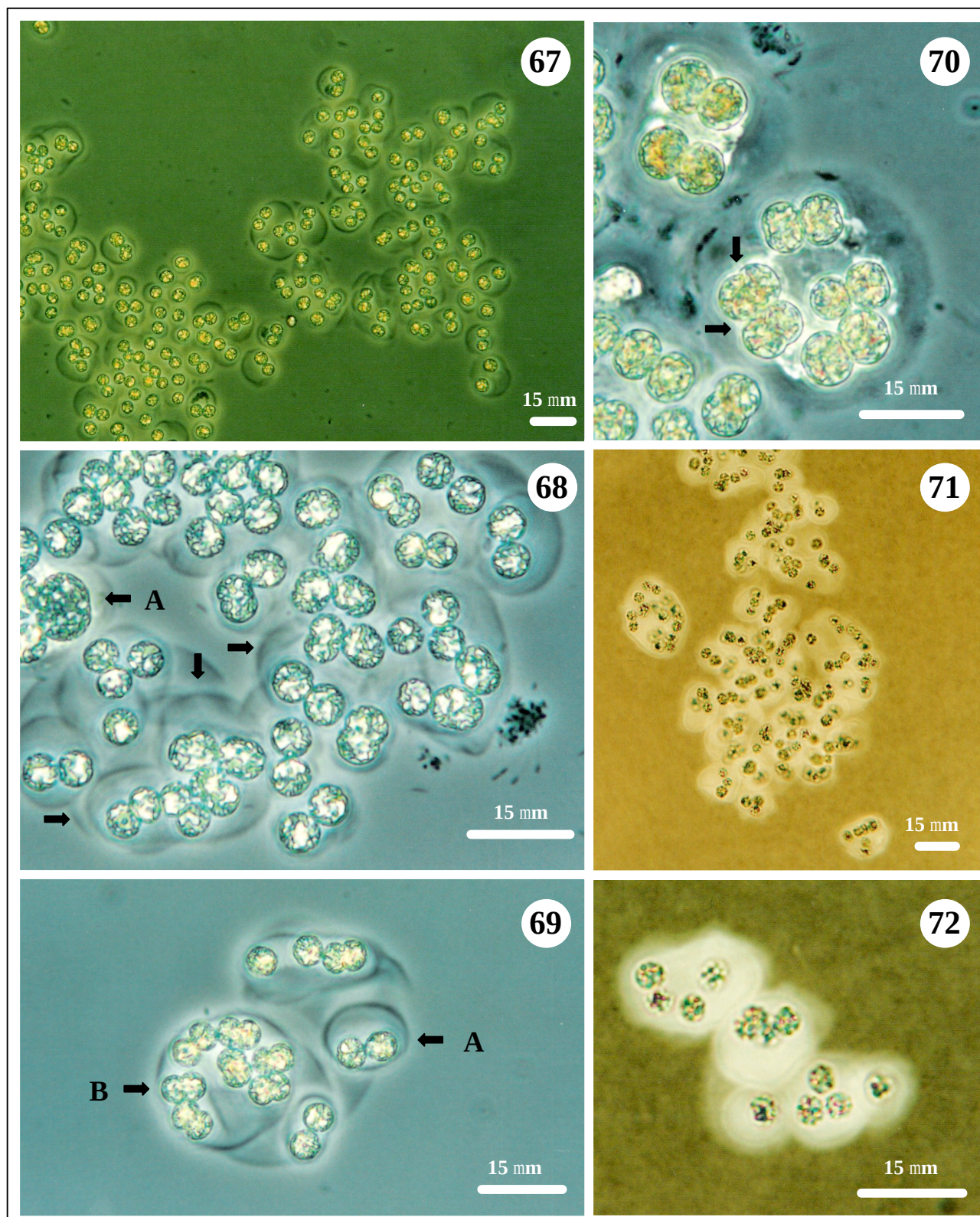
**Figuras 54-57:** *Microcystis wesenbergii* SPC774 (meio ASM-1;  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $15\text{-}20\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), contraste de fase. 54. células em divisão, notar envelope mucilaginoso individual; 55-56. colônias em estágios iniciais de desenvolvimento; 57. colônia adulta com distribuição irregular da células, notar “cicatrices” na região central da colônia. **Figuras 58-60:** *Microcystis wesenbergii* SPC771 (meio ASM-1;  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $15\text{-}20\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), com envelope mucilaginoso externo amplo, nanquim. 58. colônia composta; 59. detalhe da margem da colônia, notar envelope firme (seta); 60. colônia esférica com parte refringente rente às células (A) e parte diflúente (B), contraste de fase. **Figura 61:** *Microcystis wesenbergii* SPC774 (meio ASM-1;  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $15\text{-}20\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) colônia cilíndrica em fragmentação com envelope mucilaginoso externo diflúente amplo, com nanquim.





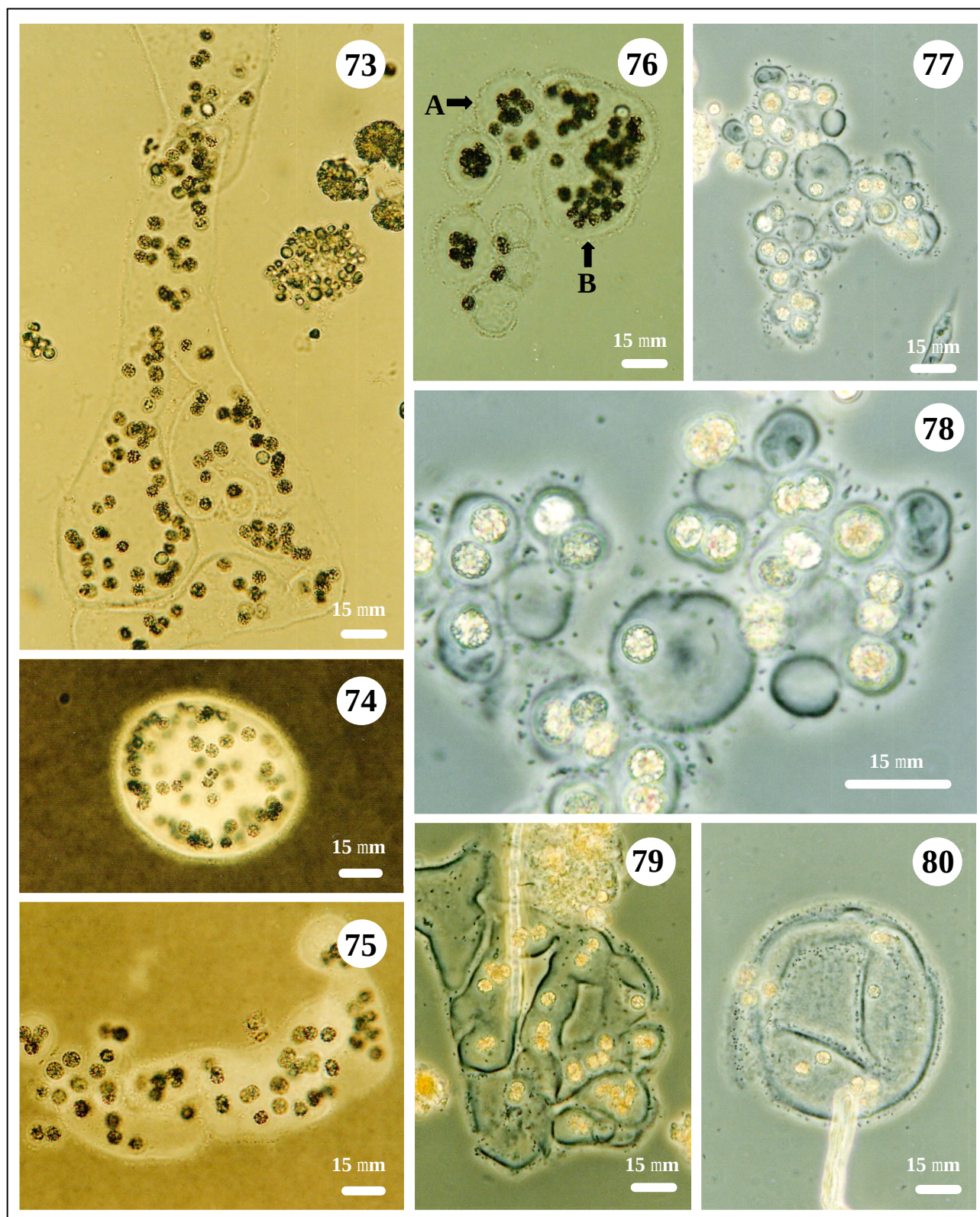
**Figuras 62-66:** *Microcystis wesenbergii* SPC771 (meio ASM-1;  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $15\text{-}20 \mu\text{mol f\u00f3ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 62: col\u00f4nia cil\u00edndrica em fragmenta\u00e7\u00e3o, notar envelope mucilaginoso lamelado se desprendendo (setas), contraste de fase; 63: fragmenta\u00e7\u00e3o da col\u00f4nia cil\u00edndrico-alongada, notar “an\u00e9is” (setas); 64: envelope mucilaginoso associado \u00e0 col\u00f4nia em fragmenta\u00e7\u00e3o (setas), contraste de fase; 65: col\u00f4nia reticulada; 66: col\u00f4nia com envelope mucilaginoso lamelado, notar que em algumas partes ela est\u00e1 se desprendendo (seta), contraste de fase.





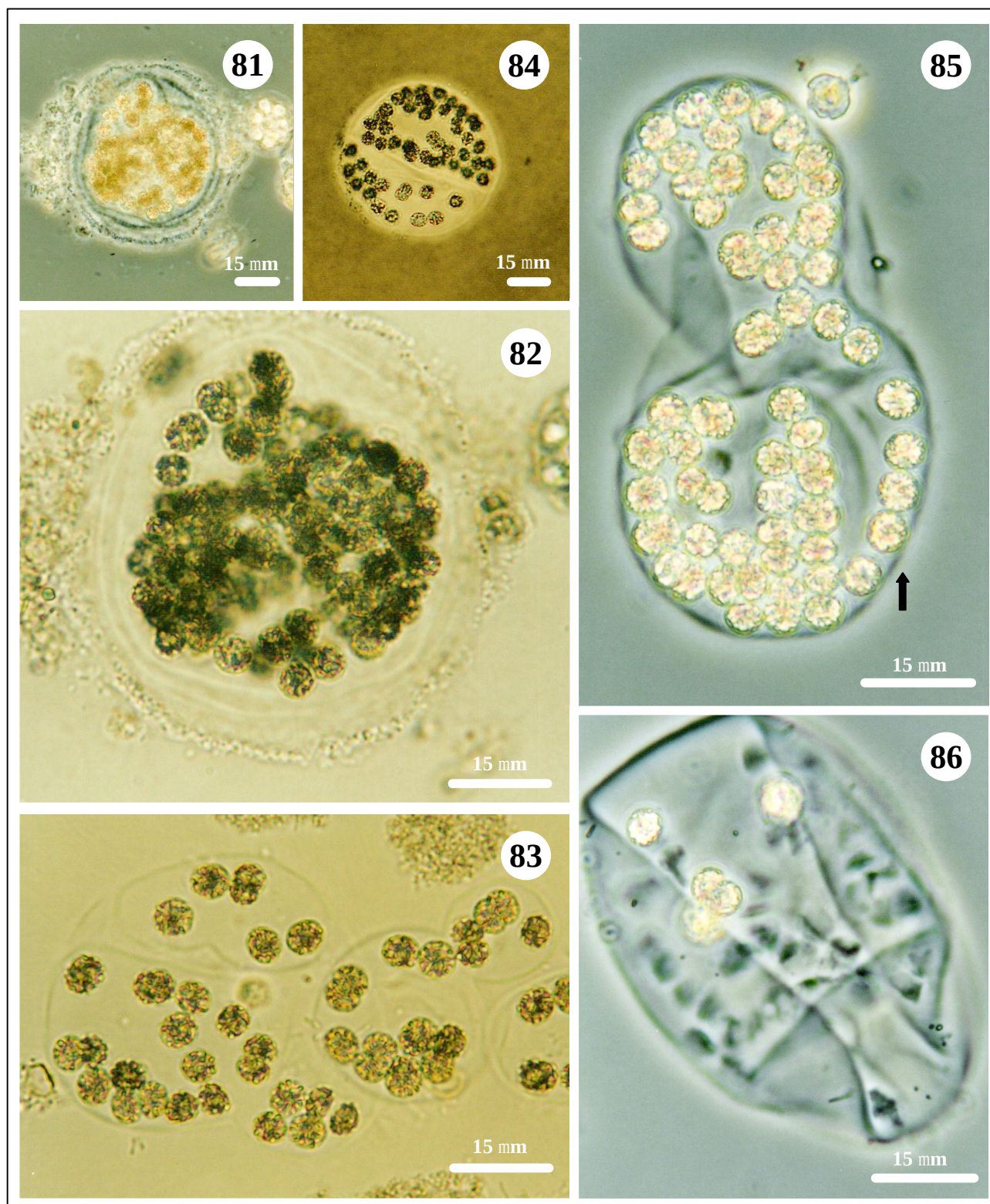
**Figuras 67-72: *Microcystis wesenbergii* SPC855** (meio ASM-1;  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $15\text{-}20 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), 67-70 contraste de fase. 67. aspecto geral com colônias esféricas; 68. colônias esféricas com envelope mucilaginoso multilamelado (seta), notar célula anômala (A); 69. colônia composta por colônias esférica jovem (A) e irregular mais desenvolvida (B); 70. divisão celular em dois planos (setas); 71-72. colônias esféricas com envelope mucilaginoso refringente e sem envelope externo difluente, com nanquim.





**Figuras 73-80: *Microcystis wesenbergii* Natureza - Pesqueiro 04 (SP355745).** 73: aspecto geral da colônia lobada; 74-75: colônias esférica e lobada sem envelope mucilaginoso externo difusante, com nanquim; 76: colônia jovem com células densamente arranjadas (A) e colônia mais desenvolvida com células dispersas (B); 77-78: fragmentação intensa da colônia formando células com envelope mucilaginoso individual (contraste de fase); 79-80: colônias com poucas células (fase senescente), contraste de fase.





**Figuras 81-82:** *Microcystis wesenbergii* Natureza - Pesqueiro 04 (SP355745) colônia esférica com envelope mucilaginoso lamelado, contraste de fase (figura 81). **Figuras 83-86:** *Microcystis wesenbergii* Natureza - Pesqueiro 07 (SP365613). 83. aspecto geral, colônias esféricas e lobadas; 84. colônia esférica jovem com envelope mucilaginoso firme, com nanquim; 85. estágio mais avançado de desenvolvimento, notar alinhamento celular (seta), contraste de fase; 86. colônia com poucas células (fase senescente), contraste de fase.

De acordo com a Tabela 11, os diâmetros médios em cultura variaram de 6,1 – 6,4  $\mu\text{m}$  (mín. 5,5; máx. 7,3  $\mu\text{m}$ ) para as cepas SPC771e SPC774 e para a cepa SPC855, o valor médio foi de 4,7  $\mu\text{m}$  (mín. 4,1; máx. 5,5  $\mu\text{m}$ ), todos com valores mínimo e máximo dentro daqueles descritos por Komárek & Anagnostidis (1999), 4,0 – 7,0  $\mu\text{m}$ . Portanto, a cepa SPC855 apresentou diâmetros médios menores e valores máximos no limite mínimo dos diâmetros encontrados para as cepas SPC771/774. Apesar da existência de dois grupos celulares na cultura, na natureza o mesmo não foi verificado, sendo que os diâmetros médios variaram de 6,1 – 6,7  $\mu\text{m}$  (mín. 4,8; máx. 7,5  $\mu\text{m}$ ), Tabela 11. Assim, diferença significativa foi encontrada entre os diâmetros médios de *Microcystis wesenbergii* em cultura (SPC855), 4,7  $\mu\text{m}$ , e na amostra que serviu de inóculo para isolamento dessa cepa (Pesqueiro 04), 6,7  $\mu\text{m}$  ( $P=0,0000$ , Anexo - Tabela 21).

Tabela 11. Diâmetro celular de *Microcystis wesenbergii* em cultura e natureza.

|                     | Diâmetro (mm)              |
|---------------------|----------------------------|
| Cultura             |                            |
| SPC771              | 6,1 $\pm$ 0,31 (5,5 - 7,1) |
| SPC774              | 6,4 $\pm$ 0,34 (5,6 - 7,3) |
| SPC855*             | 4,7 $\pm$ 0,33 (4,1 - 5,5) |
| Natureza            |                            |
| Pesqueiro 04 - SP*  | 6,7 $\pm$ 0,46 (5,6 - 7,5) |
| Pesqueiro 07 - SP   | 6,1 $\pm$ 0,52 (4,8 - 7,3) |
| Praia do Conde - PA | 6,1 $\pm$ 0,39 (5,4 - 7,5) |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão (mínimo – máximo); n=50.

\* Cepa e material da natureza com mesma procedência.

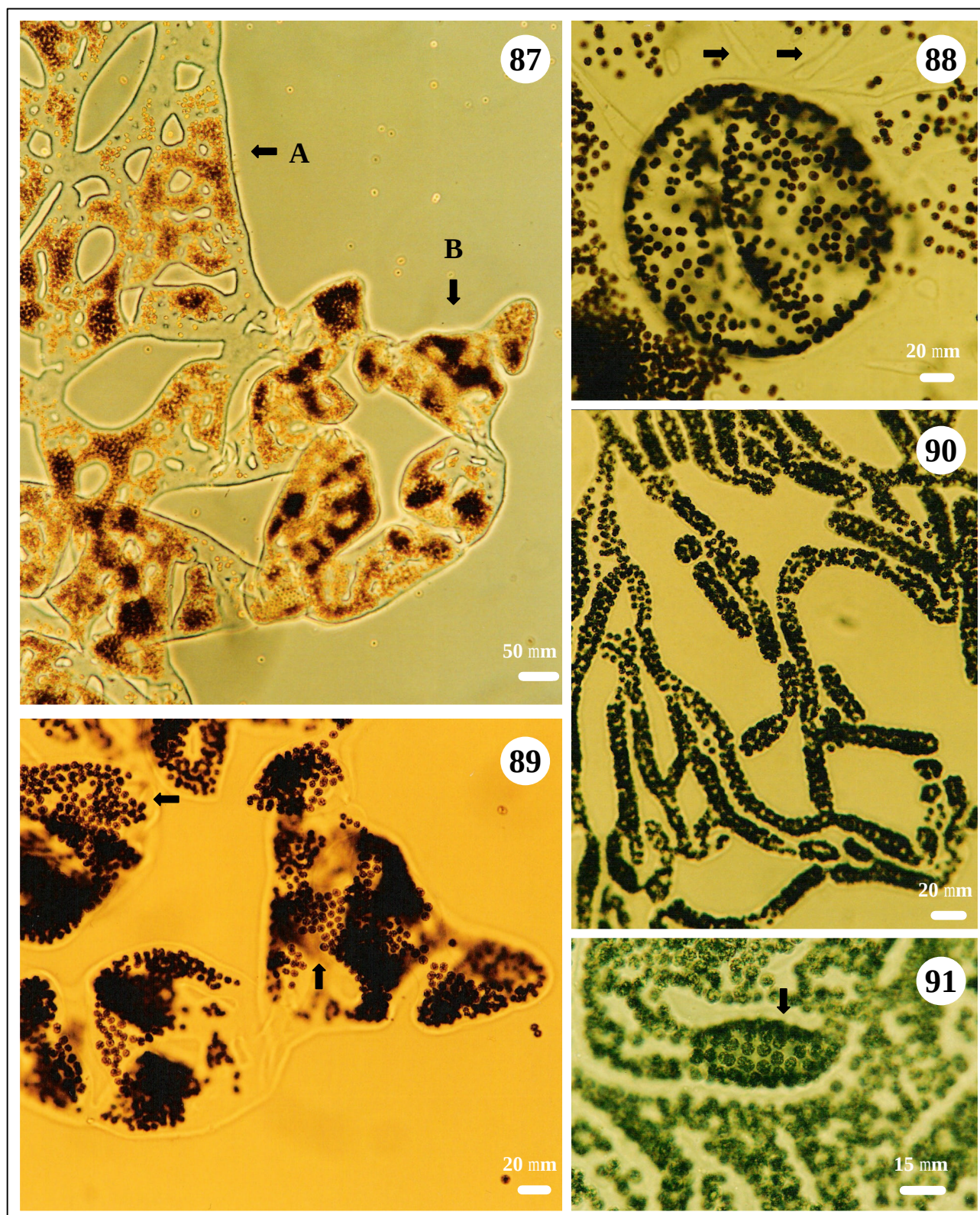
Pode-se concluir, portanto, que existem pelo menos dois tipos morfológicos de *Microcystis wesenbergii* em condições padronizadas de cultura. Um referente às cepas SPC771 e SPC774 com maior variabilidade colonial, com colônias esféricas/lobadas, cilíndricas até reticuladas e com diâmetros maiores, e outro referente à cepa SPC855, com colônias predominantemente esféricas/lobadas, nunca alongadas, sem envelope mucilaginoso externo difluente e com diâmetros celulares menores.

### 2.3.2. Experimento adicional para cepa SPC771

#### Tipo de análise: A (variação colonial das formas cilíndrica e esférica)

No primeiro exame em 21.11.04 (Tabela 12), ocorreram colônias adultas reticuladas (Figuras 90-91), às vezes com envelope mucilaginoso externo lamelado





**Figuras 87-89: *Microcystis wesenbergii* Natureza - Praia do Conde (SP365614).** 87. aspecto geral da colônia com parte reticulada (A) e parte lobada (B), contraste de fase, 88. colônia esférica, notar envelope mucilaginoso refringente reticulado (setas); 89. colônia lobada, notar partes com células dispostas em uma única camada (setas). **Figuras 90-91: *Microcystis wesenbergii* SPC771 (tipo de análise A do experimento adicional em 21.11.04).** 90. aspecto geral da colônia reticulada; 91. detalhe da colônia reticulada com parte cilíndrica apresentando células alinhadas e dispostas em uma única camada (seta).

(Figuras 92-93). Foi observada fragmentação da colônia com formação de células com envelope mucilaginoso individual (Figuras 94-95), como relatado anteriormente para a cepa SPC774 (Figuras 53-54) e amostra da natureza Pesqueiro 04 (Figuras 77-78). No segundo exame (21.12.04) houve um aumento do número de colônias reticuladas formando colônias jovens esféricas e cilíndricas (Figura 96) e da ocorrência de fragmentação colonial gerando células com envelope mucilaginoso individual (Figura 97). Nesse período apareceram as primeiras colônias atípicas com envelope mucilaginoso inconspícuo (Figura 98), podendo estar associadas às colônias reticulada (Figura 99) ou cilíndrica (Figura 100). Foi verificada também associação entre a colônia reticulada e cilíndrica (Figura 101). Provavelmente essas formas atípicas, presentes em praticamente todos os tubos com crescimento em 21.01.05 (Tabela 12), sejam produto das colônias reticuladas com envelope mucilaginoso firme e refringente.

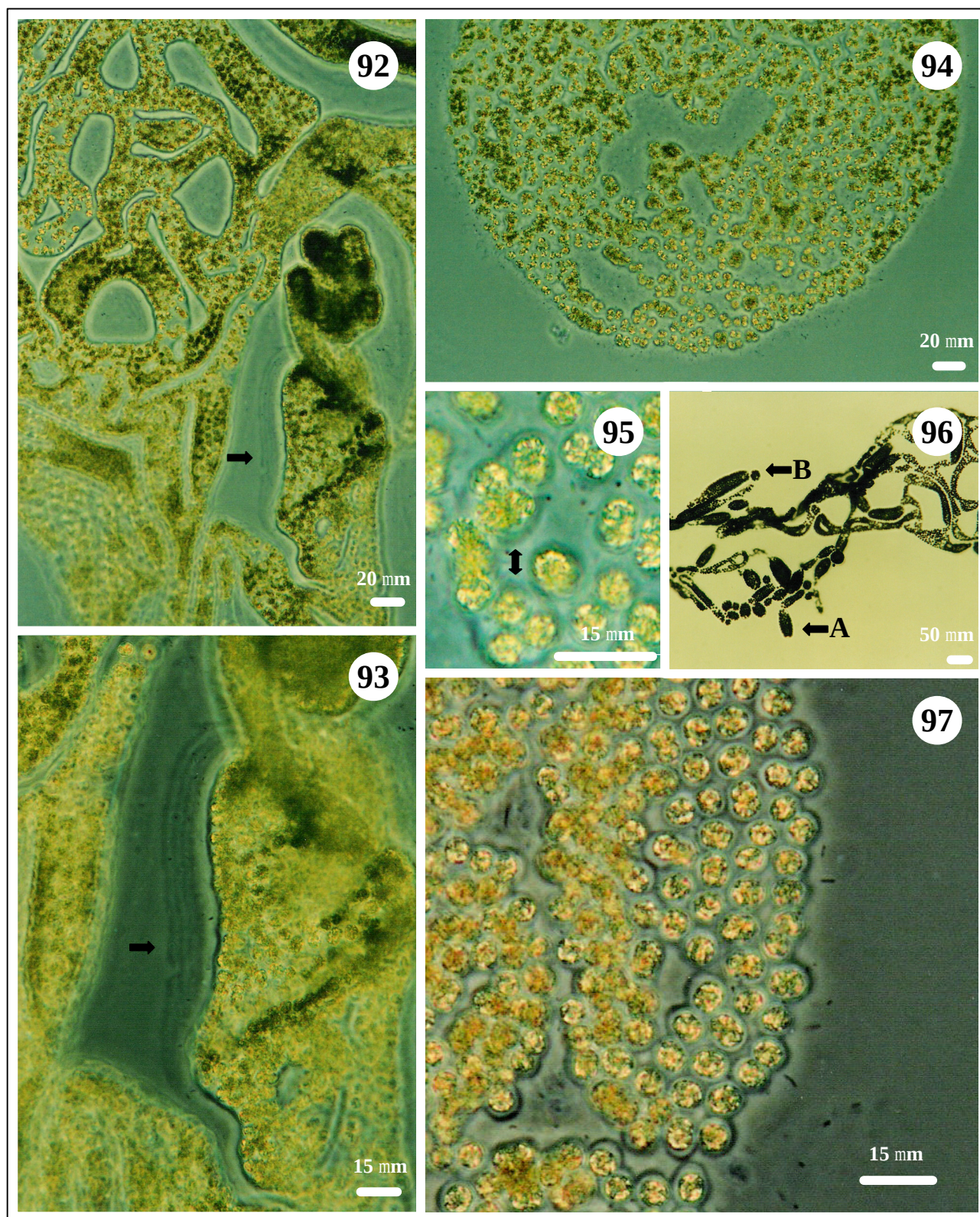
#### **Tipo de análise: B (variação colonial das formas atípica e típica)**

No primeiro exame (21.11.04), apesar da ocorrência de colônias típicas (Figura 102), houve um predomínio de colônias atípicas, ou seja, com envelope mucilaginoso inconspícuo (Figura 103). Da mesma forma, no segundo exame (21.12.04), ocorreram formas reticuladas, com envelope mucilaginoso firme (Figura 104) e colônias atípicas, porém essas gerando colônias jovens esféricas ou cilíndricas, ambas com envelope mucilaginoso firme (Figuras 105-107). Com isso, foi verificado que as colônias atípicas podem gerar formas com envelope mucilaginoso firme e representam, portanto, formas intimamente associadas, como visto no terceiro exame em 21.01.05 (Figuras 108-109).

Pode-se concluir que:

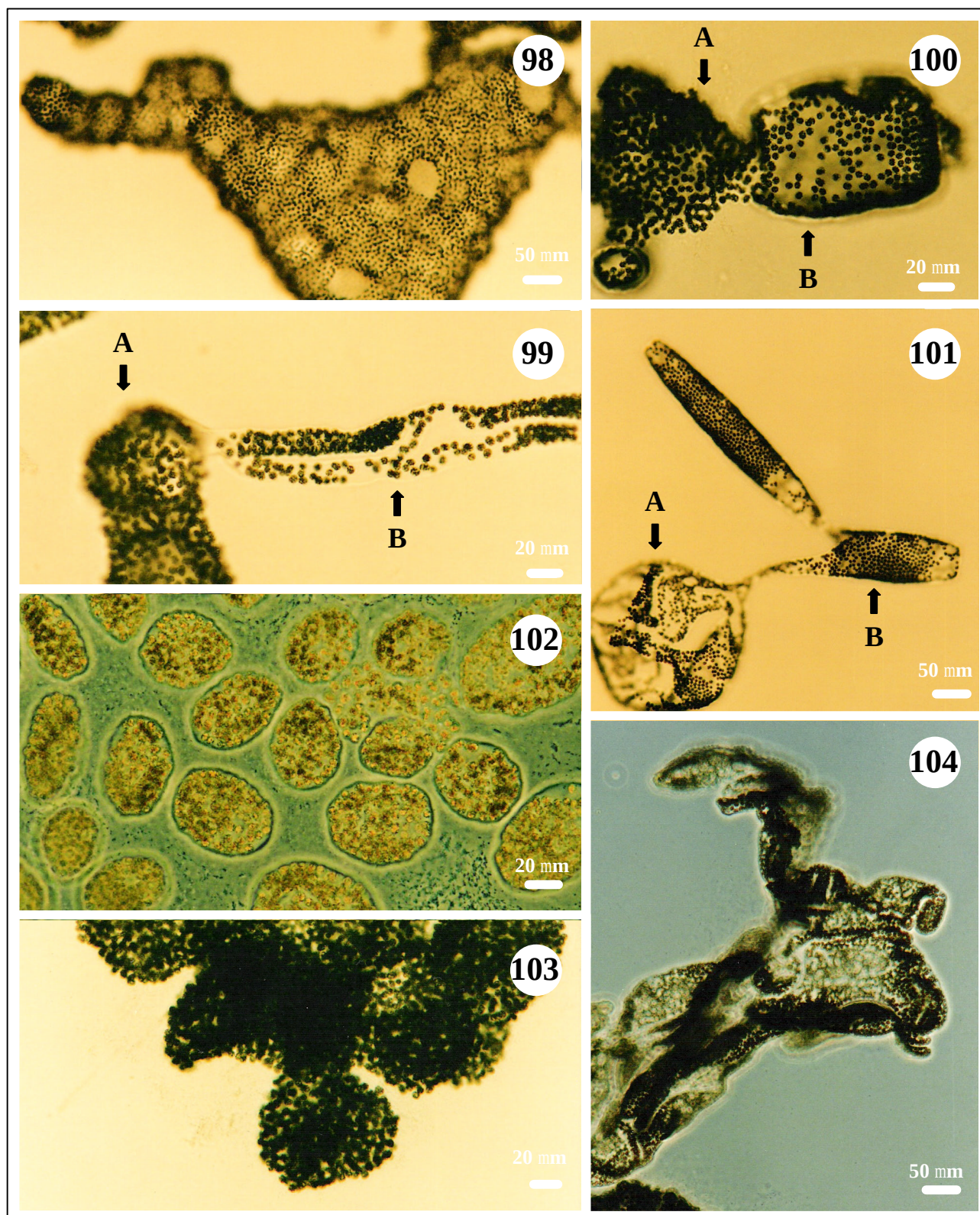
- i. colônias jovens cilíndricas podem formar colônias adultas reticuladas (com células em uma camada ou várias camadas) e posteriormente colônias atípicas, sem envelope mucilaginoso conspícuo;
- ii. formas atípicas podem originar novamente colônias jovens cilíndricas e esféricas com envelope conspícuo, características da morfoespécie.





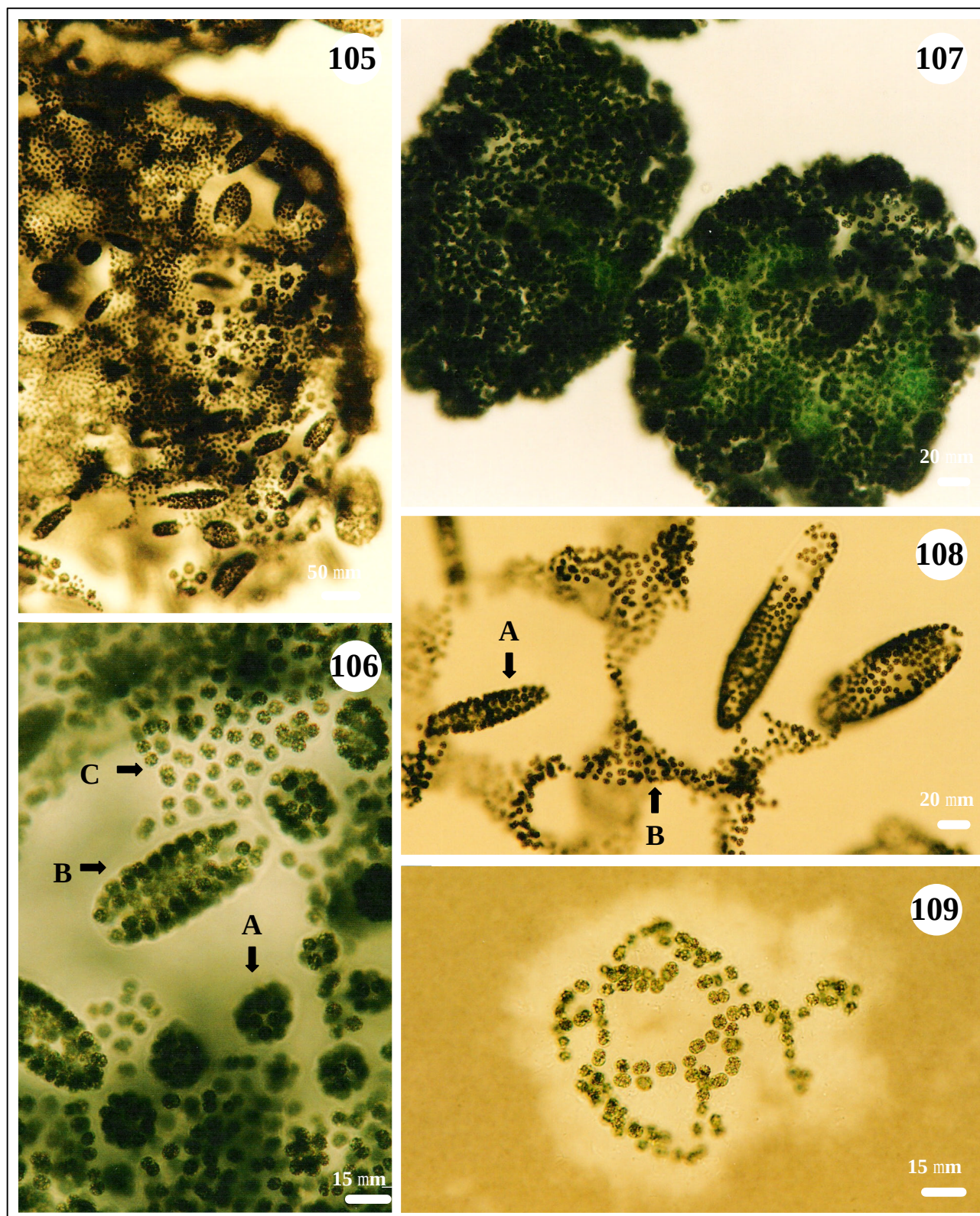
**Figuras 92-97: *Microcystis wesenbergii* SPC771 (tipo de análise A do experimento adicional). Figuras 92-95: em 21.11.04.** 92. colônia reticulada, notar envelope mucilaginoso lamelado (seta), contraste de fase; 93. detalhe da margem da colônia com envelope mucilaginoso lamelado (seta), contraste de fase; 94. colônia esférica em fragmentação com formação de células apresentando envelope mucilaginoso individual, contraste de fase; 95. detalhe do envelope mucilaginoso individual (seta), contraste de fase. **Figuras 96-97: em 21.12.04.** 96. colônia reticulada formando colônias cilíndrica (A) e esférica (B); 97. margem da colônia fragmentando e formando células com envelope mucilaginoso individual, contraste de fase.





**Figuras 98-104: *Microcystis wesenbergii* SPC771 (experimento adicional). Figuras 98-101: análise A em 21.12.04.** 98: colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo; 99. associação entre colônia atípica com envelope inconspícuo (A) e parte de uma colônia reticulada, com envelope mucilaginoso firme (B); 100. associação entre colônia atípica com envelope inconspícuo (A) e colônia cilíndrica, com envelope mucilaginoso firme (B); 101. associação entre colônia reticulada (A) e cilíndrica (B). **Figuras 102-104: análise B.** **Figura 102 (em 21.11.04):** colônias esféricas com envelope mucilaginoso firme conspícuo, contraste de fase. **Figura 103 (em 21.11.04):** margem da colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo. **Figura 104 (em 21.12.04):** colônia reticulada com envelope mucilaginoso conspícuo, refringente, contraste de fase.





**Figuras 105-109: *Microcystis wesenbergii* SPC771 (análise B do experimento adicional). Figuras 105-107: em 21.12.04.** 105: colônia atípica formando colônias esféricas e cilíndrico-alongadas; 106. colônia esférica (A) e cilíndrico-alongada (B) originando a partir de colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo (C); 107. colônias esféricas densas (envelope mucilaginoso inconspícuo) com colônias esféricas na superfície (envelope conspícuo). **Figura 108-109: em 21.01.05.** 108. colônia cilíndrica (A) associada à colônia atípica (B); 109. colônia atípica com envelope mucilaginoso difluente evidenciado por nanquim.

Tabela 12. Acompanhamento morfológico do material proveniente da cepa *Microcystis wesenbergii* SPC771, com a morfologia do material na data de isolamento, condições de manutenção do inóculo e morfologia após o crescimento referente aos 14 tubos mantidos em condições padronizadas de cultivo (meio ASM-1, 23±1°C e 15-20µmol fóton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

| <b>Tubo (análise)</b> | <b>Tipo de material isolado (data de isolamento)</b>                                               | <b>Condições iniciais antes do isolamento</b>                                           | <b>Morfologia em 21.11.04</b>                                                                                                                                                                                            | <b>Morfologia em 21.12.04</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>Morfologia em 21.01.05</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 (A)                 | 1 colônia jovem cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (29.10.04) | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), envelope mucilaginoso pode ser lamelado (Fig. 91-93) | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas, sem envelope mucilaginoso lamelado e sem reprodução por fragmentação total da colônia                                                                      |
| 2 (A)                 | 1 colônia jovem cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (29.10.04) | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Igual ao tubo 1 (A) em 21.11.04 (Fig. 90)                                                                                                                                                                                | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Sem crescimento*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 3 (A)                 | 1 colônia jovem cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (29.10.04) | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Igual ao tubo 1 (A) em 21.11.04                                                                                                                                                                                          | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas raro, envelope mucilaginoso lamelado abundante e reprodução por fragmentação total da colônia formando células com envelope mucilaginoso próprio, ocorrência de colônia atípica (Fig. 97-101) | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas, com envelope mucilaginoso lamelado e sem reprodução por fragmentação total da colônia, ocorrência de colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo |
| 4 (A)                 | 1 colônia jovem cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (30.10.04) | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20µmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                  | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Sem crescimento*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

| <b>Tubo<br/>(análise)</b> | <b>Tipo de material isolado<br/>(data de isolamento)</b>                                                                                                                    | <b>Condições iniciais<br/>antes do isolamento</b>                                       | <b>Morfologia em 21.11.04</b>           | <b>Morfologia em 21.12.04</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Morfologia em 21.01.05</b>                                                           |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 (A)                     | 1 colônia adulta cilíndrica composta por região central com células dispostas em uma camada (um plano) e extremidades adensadas (várias camadas) se fragmentando (30.10.04) | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Igual ao tubo 1 (A) em 21.11.04         | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas, envelope mucilaginoso lamelado e reprodução por fragmentação total da colônia formando células com envelope mucilaginoso próprio | Igual ao tubo 3 (A) em 21.01.05, porém com reprodução por fragmentação total da colônia |
| 6 (A)                     | 1 colônia adulta cilíndrica em processo de divisão, gerando 2 colônias (30.10.04)                                                                                           | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Igual ao tubo 1 (A) em 21.11.04         | Igual ao tubo 5 (A) em 21.12.04, porém envelope mucilaginoso lamelado e reprodução por fragmentação total da colônia ausentes                                                                                                                                                                                            | Igual ao tubo 5 (A) em 21.01.05                                                         |
| 7 (A)                     | 1 colônia adulta cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (30.10.04)                                                                         | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Sem crescimento (aspecto macroscópico)* | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Sem crescimento*                                                                        |
| 8 (A)                     | 1 colônia adulta cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (30.10.04)                                                                         | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique | Igual ao tubo 1 (A) em 21.11.04         | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas, sem envelope mucilaginoso lamelado e sem reprodução por fragmentação total da colônia (Fig. 96)                                  | Igual ao tubo 5 (A) em 21.01.05                                                         |



| <b>Tubo (análise)</b> | <b>Tipo de material isolado (data de isolamento)</b>                                                                                                                                                                             | <b>Condições iniciais antes do isolamento</b>                                             | <b>Morfologia em 21.11.04</b>                                                                                            | <b>Morfologia em 21.12.04</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Morfologia em 21.01.05</b>                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 9 (A)                 | 1 colônia jovem esférica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano) (30.10.04)                                                                                                                                 | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique   | 1 colônia esférica em fragmentação total formando células com envelope mucilaginoso individual (Fig. 94-95)              | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                                                                                                                                                                | Sem crescimento*                               |
| 10 (B)                | 1 colônia composta (tipo rede) por colônias esféricas pequenas (com 3-4 células distantes uma das outras) e envelope mucilaginoso um pouco difluente, inconspícuo e não refringente, forma não típica da morfoespécie (30.10.04) | meio ASM-1; 20±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 2 meses de repique | Colônias esféricas com células na superfície dispostas em uma (um plano) ou várias camadas (2 ou mais planos) (Fig. 102) | Colônia composta reticulada (achatada) com uma ou mais camadas de células formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), colônias esféricas, ocorrência de colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo (Fig. 104) | Igual ao tubo 5 (A) em 21.01.05                |
| 11 (B)                | Igual ao tubo 10 (B), só que bem maior (30.10.04)                                                                                                                                                                                | meio ASM-1; 20±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 2 meses de repique | Colônias lobadas, densas, com envelope mucilaginoso em sua maioria ausente (Fig. 103)                                    | Colônia atípica com envelope mucilaginoso inconspícuo formando colônia cilíndrica com células na superfície dispostas em uma camada (um plano), com reprodução por fragmentação total da colônia (Fig. 105-106)                                                        | Igual ao tubo 5 (A) em 21.01.05                |
| 12 (B)                | ± 5 colônias esféricas densas (com células dispostas em várias camadas, ocupando toda colônia), forma não típica da morfoespécie (30.10.04)                                                                                      | meio ASM-1; 23±1°C; 15-20μmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , 1 mês de repique   | Sem crescimento (aspecto macroscópico)*                                                                                  | Colônias esféricas escuras (com envelope mucilaginoso inconspícuo) compostas por subcolônias, semelhante à colônia atípica no tubo 10 (B) em 21.12.04 (Fig. 107)                                                                                                       | Igual ao tubo 5 (A) em 21.01.05 (Fig. 108-109) |

\* mantido para posterior observação

\* verificado através de análise microscópica

### 2.3.3. Crescimento e estabilidade morfométrica no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura

Em relação às taxas de crescimento (Figura 110, Anexo – Tabela 22), as variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo ( $F=2,91$ ;  $P=0,006$ , Anexo – Tabela 23). A variação da taxa de crescimento foi de  $0,0229 \text{ dia}^{-1}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $2,56 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até  $0,4701 \text{ dia}^{-1}$  ( $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $55,52 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). As menores taxas de crescimento foram registradas na irradiância de  $2,56 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , variando de  $0,0229$  a  $0,0813 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 110, Anexo - Tabela 22), independente da temperatura. Quanto ao diâmetro celular (Figura 110, Anexo - Tabela 24), o valor médio variou de  $5,4 \pm 0,28 \text{ } \mu\text{m}$  ( $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $2,56 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a  $6,0 \pm 0,39 \text{ } \mu\text{m}$  ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $13,89 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), mín. 4,7 e máx. 7,1 (Anexo - Tabela 25), sendo que houve interação significativa da irradiância a temperatura sobre esse parâmetro ( $F= 3,37$  e  $P=0,000$ ), Anexo - Tabela 26. O envelope mucilaginoso firme e refringente manteve-se estável no gradiente-cruzado, ocorrendo em todas as condições de irradiância e temperatura. Já espessura do envelope mucilaginoso difluente que envolve a margem firme e refringente das colônias apresentou variação de  $6,7 \pm 3,94 \text{ } \mu\text{m}$  ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $2,56 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a  $26,7 \pm 15,39 \text{ } \mu\text{m}$  ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $55,52 \text{ } \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), Figura 110, Anexo - Tabela 27. Os valores mínimo e máximo para todo o experimento foram: 2,1 e  $75,3 \text{ } \mu\text{m}$  (Anexo – Tabela 28). Da mesma forma que o diâmetro celular, as variáveis irradiância e temperatura interagiram significativamente sobre a espessura do envelope mucilaginoso externo ( $F= 13,88$  e  $P=0,000$ ), Anexo - Tabela 29. Pode-se perceber que os maiores valores desse parâmetro estiveram associados, em geral, às maiores temperaturas, 25 e  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 110).

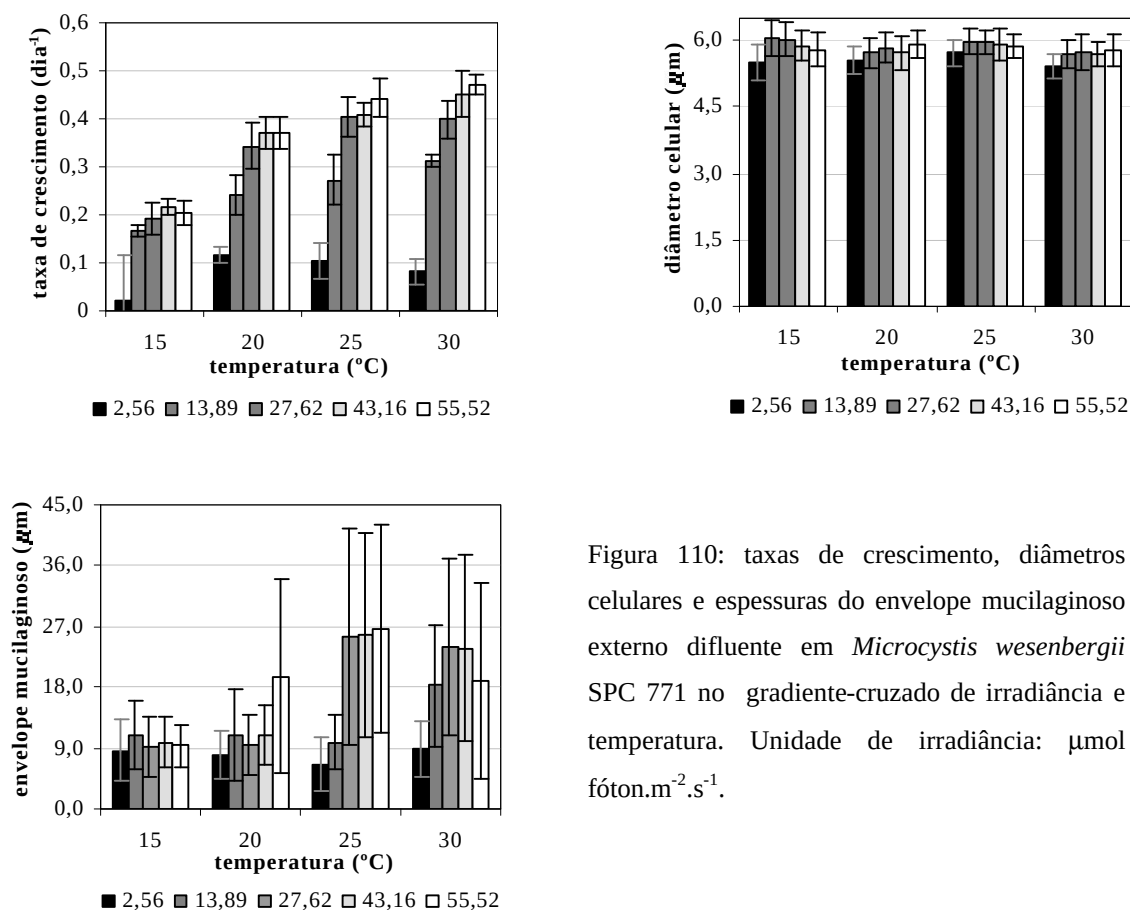
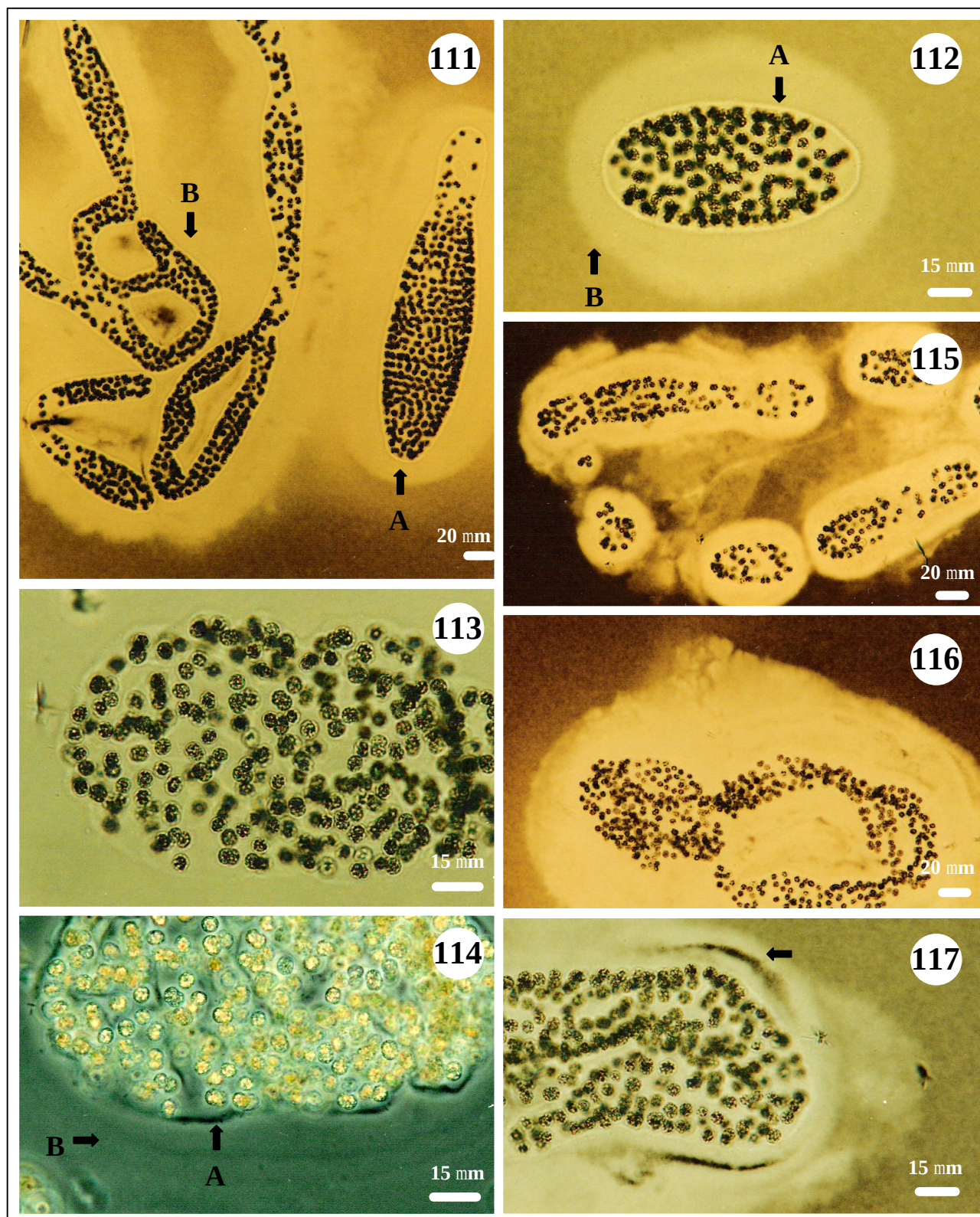


Figura 110: taxas de crescimento, di\acron{a}metros celulares e espessuras do envelope mucilaginoso externo difluente em *Microcystis wesenbergii* SPC 771 no gradiente-cruzado de irradi\acron{a}ncia e temperatura. Unidade de irradi\acron{a}ncia:  $\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$ .

### Morfologia colonial, desenvolvimento e crescimento

A an\acron{a}lise da morfologia colonial mostrou haver tend\acron{e}ncia a modifica\c{c}\~{o}es ligadas \acron{a}s taxas de crescimento. Na condi\c{c}\~{a}o controle (25 °C; 13,89  $\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$ ),  $\mu=0,2714 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 110, Anexo - Tabela 22), foram verificadas formas coloniais esf\acron{e}ricas/lobadas, cil\acron{u}ndricas e reticuladas, todas com envelope mucilaginoso externo amplo (Figuras 111-112). Nas maiores taxas de crescimento, como em 30 °C e 55,52  $\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$  com  $\mu=0,4701 \text{ dia}^{-1}$  (Figura 110, Anexo - Tabela 22), a morfologia colonial foi praticamente a mesma que no controle, por\acron{e}m as c\acron{e}lulas estiveram mais distantes uma das outras tornando as col\~{o}nias com aspecto desorganizado (Figuras 113-114). Al\acron{e}m disso, houve um grande aumento na espessura do envelope mucilaginoso externo (Figura 110, Anexo – Tabelas 27-28) nas condi\c{c}\~{o}es de altas taxas de crescimento (Figura 110, Anexo - Tabela 22) como verificado nas figuras 115-117. Ocorreu tamb\acron{e}m pequena mudan\c{c}a na textura desse envelope que apresentou-se de forma mais difluente, podendo se desprender facilmente da col\~{o}nia (Figura 117).





**Figuras 111-117: *Microcystis wesenbergii* SPC771** (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, meio ASM-1). **Figuras 111-112** ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $13,89 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  - condição controle). 111: colônias cilíndrica (A) e reticulada (B), notar envelope mucilaginoso externo difluente amplo evidenciado por nanquim; 112: colônia jovem com envelope mucilaginoso firme refringente (A) e externo difluente (B), com nanquim. **Figuras 113-117** ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $55,52 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 113: aspecto geral de colônia irregular com células distantes uma das outras; 114: detalhe da colônia com margem refringente (A) e lamelada (B), contraste de fase; 115-116: envelope mucilaginoso externo difluente extremamente amplo, com nanquim; 117: envelope mucilaginoso difluente se rompendo, notar nanquim corando parte interna (seta) desse envelope lamelado.

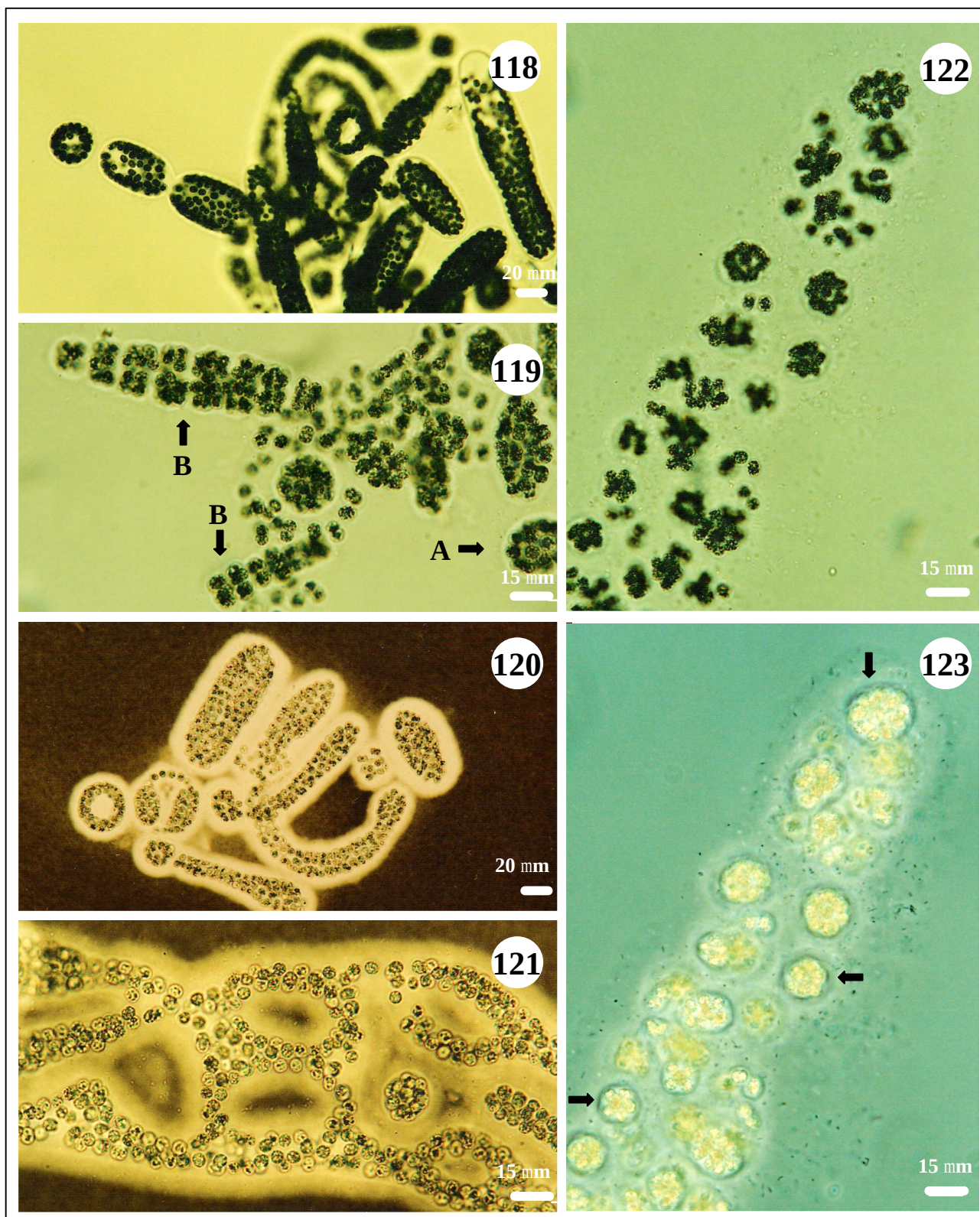
Com a diminuição da taxa de crescimento (Figura 110, Anexo - Tabela 22), na condição de 25 °C e 2,56  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $\mu=0,1027 \text{ dia}^{-1}$ ), a morfologia colonial (Figura 118) esteve muito parecida com a condição controle, porém houve grande mudança morfológica na menor taxa de crescimento,  $\mu=0,0229 \text{ dia}^{-1}$  (15 °C; 2,56  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Colônias esféricas densas com envelope mucilaginoso firme individual (Figuras 119, 122-123) resultaram da fragmentação da colônia cilíndrica, muitas vezes imersas em uma matriz mucilaginosa (Figuras 122-123). Além disso, o envelope mucilaginoso externo tornou-se menos amplo e um pouco mais firme, tanto para as colônias esféricas e cilíndricas (Figura 120), quanto para as colônias reticuladas (Figura 121).

Pode-se concluir que a organização e diâmetro das células, assim como a morfologia colonial e a espessura do envelope mucilaginoso externo, estiveram relacionados com as taxas de crescimento, ou seja, às diferentes irradiâncias e temperaturas. Apesar disso, a presença do envelope mucilaginoso firme e refringente, característico da morfoespécie, esteve presente em todas as condições e foi constante.

### **Comparação com material da natureza**

A variabilidade morfológica de *Microcystis wesenbergii* no experimento foi muito maior que aquela observada na natureza (Pesqueiro 04, Pesqueiro 07 e Praia do Conde) que apresentou predominantemente formas esféricas e lobadas. Os diâmetros celulares no experimento (controle e todas as condições) e amostras da natureza apresentaram variação de 4,7 – 7,5  $\mu\text{m}$ , muito semelhante àquela descrita por Komárek & Anagnostidis (1999), 4,0 – 7,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 13). Quanto à presença do envelope mucilaginoso externo difluente, ele ocorreu em todas as condições do gradiente-cruzado e nas maiores temperaturas ele foi mais espesso (Figura 110). Na natureza essas formas com envelope mucilaginoso externo amplo (Figuras 81-82) também ocorreram, porém de modo raro e associado apenas à forma colonial esférica.





**Figuras 118-123: *Microcystis wesenbergii* SPC771** (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, meio ASM-1). **Figura 118** ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ): colônias esféricas e cilíndrico-alongadas. **Figuras 119-123** ( $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $2,56 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). 119: colônias esférica (A) e cilíndricas em fragmentação (B), notar a formação de colônias esféricas resultantes dessa fragmentação; 120: colônias esféricas e cilíndricas com envelope mucilaginoso externo difluente amplo evidenciado por nanquim; 121: colônia reticulada com envelope mucilaginoso externo difluente amplo evidenciado por nanquim; 122: fragmentação de colônia cilíndrica formando colônias esféricas densas; 123: detalhe das colônias esféricas densas com envelope mucilaginoso firme e refringente, notar matriz mucosa envolvendo as colônias (contraste de fase).

Tabela 13. Comparação do diâmetro celular de *Microcystis wesenbergii* na cepa SPC771 (gradiente-cruzado de irradiância e temperatura: controle e todas condições), cepa SPC855 (condições de manutenção), Pesqueiro 04, Pesqueiro 07, Praia do Conde e segundo Komárek & Anagnostidis (1999).

|                                                                                              | Diâmetro (mm)                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| SPC771 controle<br>(25 °C; 13,89 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )                | 6,0 $\pm$ 0,29 (5,3 - 6,5)           |
| SPC771 todas condições<br>(15-30 °C; 2,56-55,52 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | 5,8 $\pm$ 0,37 (4,7 - 7,2)           |
| SPC855 (23 °C; 15-20 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )                            | 4,7 $\pm$ 0,33 (4,1 - 5,5)           |
| Pesqueiro 04 – SP                                                                            | 6,7 $\pm$ 0,46 (5,6 - 7,5)           |
| Pesqueiro 07 – SP                                                                            | 6,1 $\pm$ 0,52 (4,8 - 7,3)           |
| Praia do Conde – PA                                                                          | 6,1 $\pm$ 0,39 (5,4 - 7,5)           |
| Komárek & Anagnostidis (1999)                                                                | 4,0 – 7,0 (8,5 - 10,0?) <sup>*</sup> |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão (mínimo – máximo); n=50.

<sup>s</sup> variação mais valores raros entre parênteses

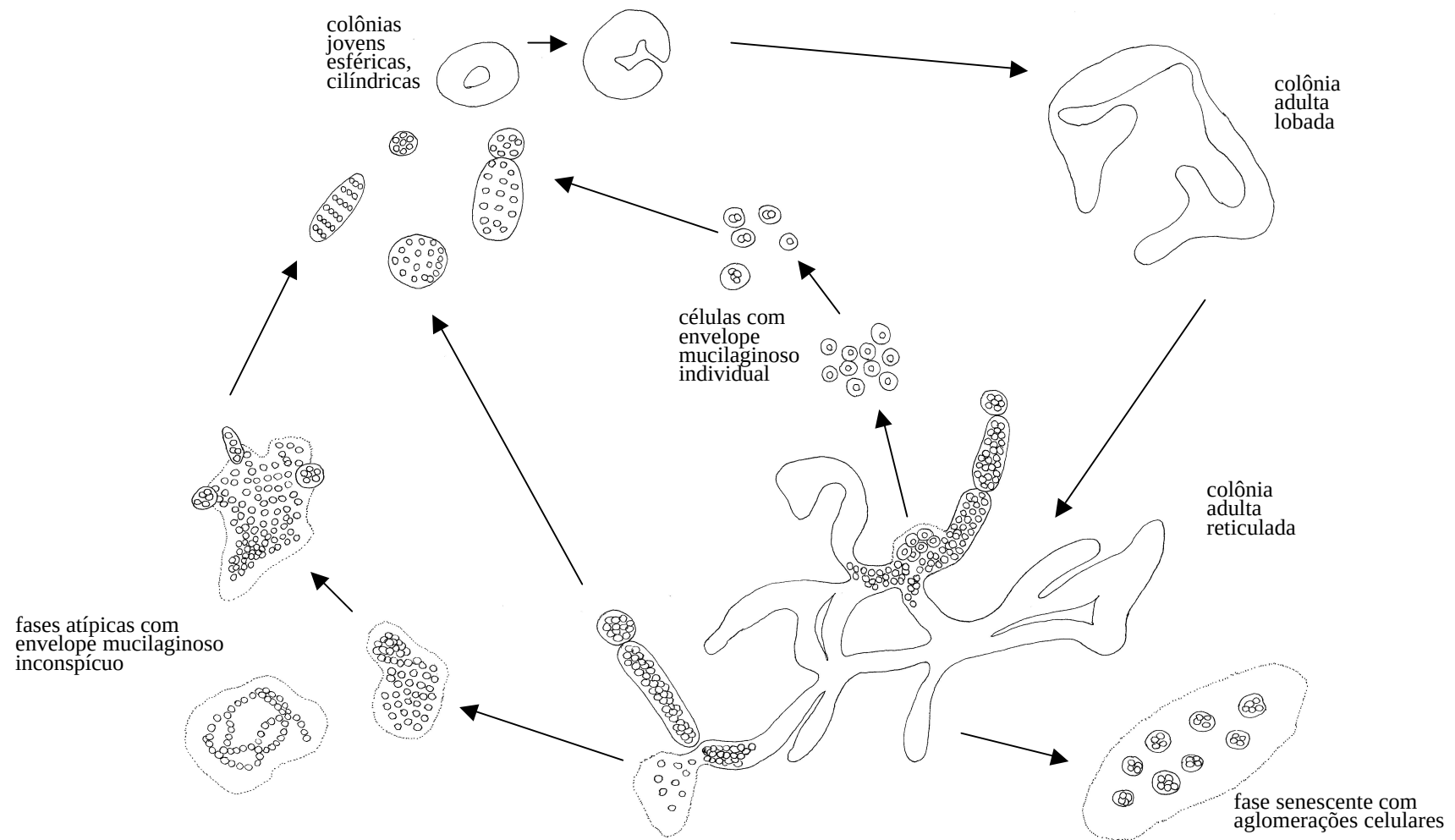
#### 2.3.4. Histórico de vida baseado nas análises de cultura (condições controladas e/ou gradiente-cruzado) e natureza

O histórico de vida de *Microcystis wesenbergii* SPC771/774 foi esquematizado na Figura 124. As colônias jovens, esféricas ou cilíndricas, formam colônias lobadas e reticuladas. A partir desse estágio, pode ocorrer fragmentação da colônia de três formas: com formação de colônias típicas da morfoespécie ou liberação de células isoladas com ou sem envelope mucilaginoso individual. Essas últimas podem formar as colônias atípicas destituídas de envelope mucilaginoso firme, refringente e conspícuo, que, por sua vez, originam novamente colônias típicas com envelope mucilaginoso firme e refringente.

#### 2.3.5. Diâmetro celular entre linhagens brasileiras e japonesas

Outra questão referente à taxonomia de *Microcystis wesenbergii* é a variação do diâmetro celular em material de cultura. Quando comparados os diâmetros celulares das cepas brasileiras e japonesas, percebe-se que os maiores valores médios referem-se às cepas brasileiras: SPC771/774 (6,1 e 6,4  $\mu\text{m}$ ) e FCLA-Ninf (7,0  $\mu\text{m}$ ), Tabela 14. Por outro lado, há também a ocorrência de diâmetros celulares bem menores como os da cepa SPC855 (4,7  $\pm$  0,33  $\mu\text{m}$ ) para o Brasil, NIES107 (4,0 – 5,0  $\mu\text{m}$ ) e TAC38/85 (< 5,0 e ca. 5,0  $\mu\text{m}$ ) para o Japão. Assim como para as cepas brasileiras, diferenciação semelhante ocorreu para as cepas japonesas. Kato *et al.* (1991) observaram padrão genotípico (aloenzimas) único para *M. wesenbergii*, apesar de diferenças do diâmetro celular para as cepas TAC38/85 (abaixo de 5,0  $\mu\text{m}$ ) e TAC 52/57 (acima de 5,5  $\mu\text{m}$ ), Tabela 4, como observado por Komárek (1991). Portanto, a variação do diâmetro celular nessa morfoespécie deve ser uma característica intraespecífica, ou seja, de





**Figura 124:** Histórico de vida de *Microcystis wesenbergii*.

diferenciação entre as cepas. Porém, é necessário que mais estudos visando a variação morfológica de *M. wesenbergii*, em cultura e natureza, sejam feitos. Principalmente entre material tropical/subtropical e de regiões temperadas.

Tabela 14. Comparação do diâmetro celular de *Microcystis wesenbergii* entre cepas brasileiras e japonesas. Em negrito, diâmetro celular com valores não maiores que 5,0 µm.

| Cepa        | Origem   | Condições        |                     |                                                               | Fotoperíodo<br>(h luz: h escuro) | Diâmetro celular (mm)               | Referência                              |
|-------------|----------|------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
|             |          | meio             | Temperatura<br>(°C) | Irradiância<br>(mmol fóton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) |                                  |                                     |                                         |
| SPC771      | Brasil 1 | ASM-1 modificado | 23 ± 1              | 15-20                                                         | 14 : 10                          | 6,1 ± 0,31 (5,5 – 7,1), n=50        | presente estudo                         |
| SPC774      | Brasil 1 | ASM-1 modificado | 23 ± 1              | 15-20                                                         | 14 : 10                          | 6,4 ± 0,34 (5,6 – 7,3), n=50        | presente estudo                         |
| SPC855      | Brasil 2 | ASM-1 modificado | 23 ± 1              | 15-20                                                         | 14 : 10                          | <b>4,7 ± 0,33 (4,1 – 5,5), n=50</b> | presente estudo                         |
| FCLA-Ninf * | Brasil 3 | BG-11 modificado | 21 ± 1              | 130                                                           | 14 : 10                          | 7,0 ± 0,14 (4,9 – 9,9), n=50        | Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> 2001 |
| TAC38       | Japão 4  | NaCB             | 20                  | 45,2                                                          | 16 : 8                           | <b>&lt;5,0 (n=50)</b>               | Kato <i>et al.</i> 1991                 |
| TAC52       | Japão 5  | NaCB             | 20                  | 45,2                                                          | 16 : 8                           | 5,5 – 6,0 (n=50)                    | Kato <i>et al.</i> 1991                 |
| TAC57       | Japão 5  | NaCB             | 20                  | 45,2                                                          | 16 : 8                           | 5,5 – 6,0 (n=50)                    | Kato <i>et al.</i> 1991                 |
| TAC85       | Japão 6  | NaCB             | 20                  | 45,2                                                          | 16 : 8                           | <b>ca. 5,0 (n=50)</b>               | Kato <i>et al.</i> 1991                 |
| NIES107     | Japão    | JM, MA ou BG-11  | 25                  | 1500*                                                         |                                  | <b>4-5</b>                          | Neilan <i>et al.</i> 1997               |
| NIES112     | Japão    | JM, MA ou BG-11  | 25                  | 1500*                                                         |                                  | 5-6                                 | Neilan <i>et al.</i> 1997               |

\*como morfotipo M5; 1 = Lago de Peixes, Ribeirão Preto; 2 = Pesqueiro 04 – SP; 3 = Reservatório da Usina de Santa Rita, Maracá – SP; 4 = Lago Kasumigaura, Ibaraki; 5 = Lago Suwa-ko, Nagano; 6 = Pond Ukinuno-no-ike, Shimane; \*lux.



## Discussão geral

De acordo com os experimentos de gradiente-cruzado, as variáveis irradiância e temperatura apresentaram efeito significativo sobre as taxas de crescimento de *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii* (Anexo – Tabelas 4, 14, 23). O mesmo foi verificado em experimento para outras espécies de cianobactérias: *Microcystis flos-aquae*, *Chroococcus minutus* (Kützinger) Nägeli e *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek (Bouchamma & Derraz 2004), isoladas de um corpo d'água eutrófico no Marrocos. Conforme esses autores, as três espécies apresentaram diferentes taxas de crescimento, sendo que *P. agardhii* teve a maior taxa de crescimento, seguida por *M. flos-aquae* e *C. minutus*. O padrão das taxas de crescimento das morfoespécies de *Microcystis* estudadas foi similar entre *M. aeruginosa* SPC522 (Figura 16) e *M. wesenbergii* SPC771 (Figura 110), em todas as condições do gradiente-cruzado, porém *M. panniformis* SPC702 diferiu pelas taxas de crescimento quase nulas à 15 °C (Figura 35). Isso está de acordo com a ocorrência de *M. panniformis* restrita, até o momento, à região tropical/subtropical do Brasil (Komárek *et al.* 2002), e cujos corpos d'água dificilmente apresentam temperaturas próximas à 15 °C. Portanto, há fortes indícios de que a taxa de crescimento em diferentes irradiâncias e temperaturas tenha um significado de diferenciação interespecífica. Mais cepas das morfoespécies estudadas deveriam ser submetidas ao gradiente-cruzado para confirmar realmente se os diferentes padrões de taxas de crescimento teriam significado interespecífico ou intraespecífico, ou seja, relacionado à cepa.

A morfologia colonial das três morfoespécies em cultura variou no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura. Para *M. aeruginosa* SPC522, nas maiores taxas de crescimento (Figura 16) observou-se maior variabilidade na forma das colônias. Nas menores taxas de crescimento houve predomínio de colônias esféricas (Figuras 14-15, 21-23) enquanto que nas maiores taxas, de colônias lobadas, irregulares, às vezes clatradas (Figuras 17-20). Para *M. panniformis* (Figuras 43-46) e *M. wesenbergii* (Figuras 122-123), formas senescentes, com aglomerações celulares envoltas por envelope mucilaginoso amplo, foram verificadas à temperatura de 15 °C. A variação da espessura do envelope mucilaginoso no gradiente-cruzado para *M. aeruginosa* esteve dentro daquela encontrada nas cepas em condições de manutenção e na natureza, enquanto que para *M. panniformis*,

cujo valor máximo foi de 15,7  $\mu\text{m}$  em fase senescente à 15 °C e 13,89  $\mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (gradiente-cruzado), Anexo – Tabela 19, não apresentou valores acima de 4,8  $\mu\text{m}$  na natureza (Tabelas 8-9). Para *M. wesenbergii*, ocorreram fases atípicas cujo envelope mucilaginoso firme e refringente não esteve presente. Além disso, no gradiente-cruzado o envelope mucilaginoso externo difluente variou de 2,1 – 75,3  $\mu\text{m}$  (Figura 110, Anexo – Tabelas 27-28), enquanto que em condições de manutenção variou de 3,3 – 10,8  $\mu\text{m}$  (Tabela 10) e foi ausente na natureza. Para *M. aeruginosa*, a espessura do envelope variou de estreito na natureza (semelhante à *M. panniformis* forma típica), Figura 9, à extremamente amplo, atingindo valor de 76,8  $\mu\text{m}$  na cultura (Tabela 6). A textura do envelope mucilaginoso, difluente em *M. aeruginosa*/*M. panniformis* e firme em *M. wesenbergii*, não variou nas condições de cultura e natureza. Os aerótopos estiveram presentes em quase todas as condições de cultura (manutenção e gradiente-cruzado), sendo ausente em algumas colônias de *M. panniformis* SPC702 nas maiores taxas de crescimento do gradiente-cruzado (Figuras 36-39).

Na natureza, variação na forma da colônia, densidade/distribuição das células, espessura do envelope mucilaginoso de *Microcystis aeruginosa* foi verificada por Reynolds *et al.* (1981) em experimento *in locu* sobre o ciclo de vida anual dessa morfoespécie. Colônias bentônicas com aglomerações celulares e envelope mucilaginoso amplo, muito semelhantes às formas senescentes de *M. panniformis* e *M. wesenbergii* à 15 °C no gradiente-cruzado, foram relatadas como estágio de desenvolvimento de *M. aeruginosa*. Da mesma forma, segundo Yunes *et al.* (1998), essas colônias senescentes de *M. aeruginosa* foram vistas na Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, no fim do inverno cujas temperaturas variaram de 15 – 19 °C. Portanto, baseado nestes estudos de *M. aeruginosa* em condições desfavoráveis de crescimento (baixas temperaturas) na natureza, as fases senescentes que ocorreram no gradiente-cruzado para *M. panniformis* (Figuras 43-46) e *M. wesenbergii* (Figuras 122-123) na temperatura de 15 °C representam, então, estágios de desenvolvimento dessas morfoespécies. De acordo com Yunes *et al.* (1998), houve grande aumento da variabilidade morfológica de *M. aeruginosa* no verão de 1995 e 1996, com temperaturas médias sempre acima de 20 °C, quando comparado ao inverno, que apresentou apenas estágios senescentes. Esse aumento da variabilidade ocorreu também no gradiente-cruzado para *M. aeruginosa* SPC522, com colônias esféricas nas menores taxas

de crescimento e colônias lobadas, irregulares ou clatradas nas maiores taxas. Portanto, a morfologia colonial das espécies estudadas estiveram associadas às diferentes irradiâncias e temperaturas no gradiente-cruzado, e provavelmente o mesmo pode ocorrer na natureza.

Apesar do diâmetro celular de *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii* ser influenciado pela irradiância e temperatura conforme resultados obtidos (Anexo – Tabelas 7, 26), a variação do diâmetro das três morfoespécies no gradiente-cruzado esteve dentro daquela encontrada para a cultura (condições de manutenção) e natureza. Porém, observou-se sobreposição dos limites métricos entre as morfoespécies: 3,4 – 4,9  $\mu\text{m}$  (*M. panniformis*), 4,2 – 6,9  $\mu\text{m}$  (*M. aeruginosa*) e 4,1 – 7,5  $\mu\text{m}$  (*M. wesenbergii*), Tabelas 8, 6 e 11. Similarmente, Kato *et al.* (1991) e Otsuka *et al.* (1999) observaram sobreposição entre os diâmetros celulares de morfoespécies de *Microcystis* para o Japão e, segundo Komárek & Komárková (2002), esta variabilidade é comum no plâncton. Assim, o diâmetro celular não deve ser utilizado isoladamente na identificação das morfoespécies.

Além do diâmetro celular, certos estágios de desenvolvimento das morfoespécies podem ser semelhantes e de difícil identificação. *Microcystis aeruginosa* apresentou formas coloniais com envelope mucilaginoso estreito na natureza (Figuras 08-09), semelhante à colônia de *M. panniformis* (Figuras 27, 32). Por outro lado, essa última morfoespécie apresentou fase senescente com aglomerações celulares e envelope mucilaginoso amplo (Figuras 43-46), semelhante com *M. aeruginosa* típica ou *M. ichthyoblabe* (Komárek 1991). Para *Microcystis wesenbergii*, Otsuka *et al.* (2000), analisando cepas japonesas (NC1 e NC5) e tailandesas (TC4 e TC7), identificaram, além das colônias típicas da morfoespécie com envelope mucilaginoso firme refringente (denominadas morfotipo WES1 e WES2), formas atípicas sem margem visível, ou seja, com envelope mucilaginoso inconspícuo (denominadas morfotipo WES3). Como o morfotipo WES3 é muito similar à formas coloniais de *M. aeruginosa* e *M. ichthyoblabe*, e ocorreu junto das colônias típicas de *M. wesenbergii* nas cepas TC4 e TC7, Otsuka *et al.* (2000) concluíram que era impossível distinguir *M. wesenbergii* de *M. aeruginosa* e *M. ichthyoblabe*. Através do experimento adicional para cepa SPC771 foi verificado que as colônias atípicas (Figuras 98, 103), sem envelope mucilaginoso firme, podem formar colônias típicas da morfoespécie, ou seja, com envelope mucilaginoso firme e refringente (Figuras 105-108). Portanto, essas formas atípicas representam uma parte do histórico de vida de *M.*



*wesenbergii*, que em determinada fase de desenvolvimento, formam colônias típicas da morfoespécie. Assim, a morfologia colonial das três morfoespécies estudadas mostraram haver estágios, em geral raros e atípicos, semelhantes entre si. Apesar disso, existem algumas morfoespécies como *Microcystis aeruginosa* e *M. flos-aquae*, estáveis na morfologia e sem estágios iguais quando nas mesmas condições de cultivo (Doers & Parker 1988).

A análise conjunta das características forma da colônia, diâmetro celular e envelope mucilaginoso, feita por Komárek (1991), foi necessária para identificar as morfoespécies de *Microcystis* no Japão. Isso devido à ocorrência de fases morfológicas semelhantes entre diferentes morfoespécies. Por exemplo, a fase senescente de *M. panniformis* (3,6 – 4,9  $\mu\text{m}$ , 15 °C; 27,62  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  no gradiente-cruzado, Anexo – Tabela 16) pode ser separada de *M. aeruginosa* (4,8 – 6,3  $\mu\text{m}$ , 15 °C; 27,62  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  no gradiente-cruzado, Anexo – Tabela 6) pelo diâmetro celular, assim como de *M. ichthyoblabe* (espécie de região temperada) que apresenta diâmetros celulares bem menores, 2,0 – 3,2  $\mu\text{m}$  (Komárek 1991). O diâmetro celular pode separar também as formas de *M. aeruginosa* (4,8 – 6,5  $\mu\text{m}$ ) com envelope mucilaginoso estreito (0,0  $\mu\text{m}$ ), Tabela 6, e *M. panniformis* (3,5 – 4,8  $\mu\text{m}$ ), Tabela 8, na natureza. Quanto à fase atípica de *M. wesenbergii* (Figuras 52, 98, 103), apesar da sobreposição dos diâmetros celulares com *M. aeruginosa*, o diâmetro celular máximo para *M. aeruginosa* foi de 6,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 6), enquanto que atingiu 7,5  $\mu\text{m}$  em *M. wesenbergii* (Tabela 13).

Portanto, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii* podem ser identificadas morfológicamente através da análise conjunta dos parâmetros forma da colônia, distribuição/densidade das células, espessura do envelope mucilaginoso e diâmetro celular. A variação dos caracteres em cultura (condições de manutenção e gradiente-cruzado) esteve dentro daquela reportada para as morfoespécies descritas para a natureza. Primeiro, foi confirmada a existência de morfoespécies estáveis de *Microcystis* com estágios característicos (Komárek & Komárková 2002, Komárek 2003a) que ocorrem na natureza e cultura. Além disso, as fases atípicas e senescentes, não identificáveis, representam estágios de desenvolvimento dentro do histórico de vida de cada morfoespécie. Segundo, a cultura mostrou ser importante ferramenta no estudo morfológico para *Microcystis*, como verificado por Honda & Azevedo (2004) em estudos morfológicos de

outros gêneros de cianobactérias. O experimento de gradiente-cruzado de irradiância e temperatura, útil na análise da estabilidade das características morfológicas e estudo de fases atípicas/senescentes, pode ser utilizado na caracterização fenotípica (morfologia, fisiologia etc) de cepas de cianobactérias.

### Conclusões e sugestões

- foi confirmada a existência das morfoespécies *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii*, identificadas pelas características diacríticas forma da colônia, distribuição/densidade das células, espessura/textura do envelope mucilaginoso e diâmetro celular;
- as características diacríticas utilizadas na identificação dessas morfoespécies foram semelhantes em cultura, nas condições de manutenção, e natureza;
- em diferentes irradiâncias e temperaturas (gradiente-cruzado), as características diacríticas apresentaram variação, porém em geral dentro daquela presente na natureza;
- além das formas características, formas senescentes e atípicas ocorreram na cultura (gradiente-cruzado) e essas formas representam parte do histórico de vida das morfoespécies;
- a morfoespécie descrita para ambientes tropical e subtropical *M. panniformis* foi sensível à 15 °C, diferente de *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii*;
- pela primeira vez o envelope mucilaginoso difluente externo foi documentado para *M. wesenbergii* e provavelmente tenha significado taxonômico na diferenciação de cepas dessa morfoespécie.

#### Sugere-se:

- analisar o histórico de vida de outras cepas das morfoespécies estudadas e outras que ocorrem no Brasil (*Microcystis botrys*, *M. protocystis* e *M. viridis*);
- comparar a morfologia de cepas de *Microcystis* isoladas de diferentes regiões do Brasil;
- realizar mais estudos relacionados à expressão fenotípica (morfologia, fisiologia, bioquímica etc) e genotípica (outros genes além do RNAr 16S) para uma melhor definição de espécie em cianobactérias.

## Resumo

RESUMO – (Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp. (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo). Os objetivos foram verificar a variabilidade e estabilidade morfológica de *Microcystis* spp. em cultura e natureza, assim como comparar as morfoespécies. Dez cepas pertencentes à três morfoespécies (*Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii*) foram submetidas à análise morfológica em condições controladas de cultivo (meio ASM-1,  $23 \pm 1$  °C,  $20 - 25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 14 h claro: 10 h escuro). Para o gradiente-cruzado de irradiância e temperatura (meio ASM-1, 15/20/25/30 °C, 2,6/13,9/27,6/43,2/55,5  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 14 h claro: 10 h escuro) foram utilizadas três cepas: *M. aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC771. *M. panniformis* foi sensível à temperatura de 15 °C, enquanto que o mesmo não ocorreu para *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii*. Quanto aos caracteres analisados (forma da colônia, distribuição/densidade das células, espessura/textura do envelope mucilaginoso e diâmetro celular), de modo geral, não houve diferenças entre material em cultura e natureza. Além das fases características, fases atípicas ou senescentes foram verificadas para as três morfoespécies. As fases senescentes com aglomerações celulares e envelope mucilaginoso amplo foram verificadas em *M. panniformis* e *M. wesenbergii* à 15 °C (gradiente-cruzado). A análise conjunta das características diacríticas possibilitou a identificação das morfoespécies, confirmando a validade dessas morfoespécies.

Palavras chave: cianobactéria, *Microcystis*, taxonomia, cultura, irradiância e temperatura.

ABSTRACT – (Taxonomy and development of *Microcystis* strains (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isolated from water bodies in São Paulo). This paper aimed the study of morphological variability of *Microcystis* spp. under culture conditions and nature. Ten strains belonging to three morphospecies (*Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii*) were analyzed under controlled culture conditions (ASM-1 medium,  $23 \pm 1$  °C,  $20 - 25 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 14 h: 10 h light-dark cycle). For cross-gradient experiments (ASM-1 medium, 15/20/25/30 °C, 2.6/13.9/27.6/43.2/55.5  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 14 h: 10 h light-dark cycle) three strains were used: *M. aeruginosa* SPC522, *M. panniformis* SPC702 e



*M. wesenbergii* SPC771. The only strain without growth under 15 °C belonged to *M. panniformis*. From morphological characteristics (colonial form, distribution/density of cells, width/structure of mucilaginous envelope and cell diameter), no differences were noted between material from culture and nature. In addition to common stages, atypical stages were found for the three morphospecies. The senescent morphologies with clusters of cells and wide mucilaginous envelope occurred in *M. panniformis* and *M. wesenbergii* at 15 °C (cross-gradient experiment). The analysis using all the diacritic characteristics together allowed the identification of *Microcystis* morphospecies and confirmed the validation of these taxa.

Keywords: cyanobacteria, *Microcystis*, taxonomy, culture, irradiance and temperature.

## Referências

- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 1-Introduction. *Algological Studies* 38/39: 291-302.
- Azevedo, M.T.P.** 1991. Edaphic blue-green algae from São Paulo Botanical Garden, Brazil. *Algological Studies* 64: 503-526.
- Azevedo, M.T.P. & Kováčik, L.** 1996. *Rhabdogloea brasílica* sp. nov. (Chroococcales, Synechococcaceae): morphological and morphometric variability under cross-gradient cultures. *Algological Studies* 83: 83-92.
- Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L.** 1994. *Hormothece geitleriana*: a new edaphic chroococcal Cyanophyceae from São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 75: 79-83.
- Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L.** 1999. *Coelosphaerium evidenter-marginatum*, a new planktonic species of Cyanophyceae/Cyanobacteria from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Algological Studies* 94: 35-43.
- Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L.** 2003. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algological Studies* 109: 79-92.
- Azevedo, M.T.P., Sant'Anna, C.L., Senna, P.A.C., Komárek, J. & Komárková, J.** 2003. Contribution to the microflora of chroococcalean cyanoprokaryotes from São Paulo State, Southeast Brazil. *Hoehnea* 30: 285-295.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K.** 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181-182: 441-446.
- Bicudo, D.C.** 1985. *Borzia* Cohn ex Gomont: only a hormogone or a true genus of blue-green algae? *Algological Studies* 41: 489-493.
- Bittencourt-Oliveira, M.C.** 2000. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz. (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algological Studies* 99: 29-37.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Kujbida, P., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Moura, A.N., Colepicolo, P. & Pinto, E.** 2005. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 687-694.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Oliveira, M.C. & Bolch, C.J.S.** 2001. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *Journal of Phycology* 37: 810-818.
- Bouchamma, E.O. & Derraz, M.** 2004. Interaction of light and temperature effects on the growth rate of three Cyanobacteria species isolated from El kansera impoundment (Morocco). *Algological Studies* 113: 129-141.
- Carmichael, W.W.** 1996. Toxic *Microcystis* and the environment. In: M.F. Watanabe, K-I. Harada, W.W. Carmichael & H. Fujiki (eds.). *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-12.
- Doers, M.P. & Parker, D.L.** 1988. Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos-aquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implications. *Journal of Phycology* 24: 502-508.
- Fogg, G.E.** 1975. The characteristics of algal growth in cultures of limited volume. In: *Algal cultures and phytoplankton ecology*, 2<sup>nd</sup> edition. The University of Wisconsin Press, London, pp. 13-36.
- Geitler, L.** 1932. Cyanophyceae. In Dr. L. Rabenhorst's *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 14(2) (Kolkwitz, R. ed.) Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H. 1196 p.
- Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J. & Kersters, K.** 2001. Polyphasic Taxonomy. In: D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup>

- edition – Volume One, *The Archaea and The Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer-Verlag, United States of America, pp. 43-48.
- Honda, R.Y. & Azevedo, M.T.P.** 2004. Estudos taxonômicos em culturas de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, (PEFI), São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea* 31: 151-169.
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E.A. & Zwart, G.** 2003. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6634-6643.
- Kato, T., Watanabe, M.F. & Watanabe, M.** 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Algological Studies* 64: 129-140.
- Komárek, J.** 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Algological Studies* 64: 115-127.
- Komárek, J.** 2003a. Problem of the taxonomic category “species” in cyanobacteria. *Algological Studies* 109: 281-297.
- Komárek, J.** 2003b. Coccoid and colonial Cyanobacteria. In: J.D. Wehr & R.G. Sheath (eds.). *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification*. Academic Press, San Diego, pp. 59-116.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** 1999. Cyanoprokaryota, 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Band 19/1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 548 p.
- Komárek, J. & Azevedo, M.T.P.** 2000. *Geitlerinema unigranulatum*, a common tropical cyanoprokaryote from freshwater reservoirs in Brazil. *Algological Studies* 99: 39-52.
- Komárek, J. & Komárková, J.** 2002. Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology* 2: 1-24.
- Komárek, J., Komárková-Legnerová, J., Sant’Anna, C.L., Azevedo, M. T. P. & Senna, P.A.C.** 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie Algologie* 23: 159-177.
- Molica, R.J.R.** 1996. Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin (Cyanophyceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 88 p.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., Goodman, A.E.** 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic Cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:693-697.
- Oliveira, B.A.D.** 1976. Contribuição ao estudo taxonômico das cianofíceas heterocitadas continentais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Tese de Livre Docência, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 140 p.
- Oliveira, B.A.D.** 1978. Contribuição ao estudo taxonômico das cianofíceas filamentosas da região de São José do Rio Preto, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 79 p.
- Oliveira, M.S.B., Oliveira, N.A., Dainesi, M.B. & Cardoso, E.J.B.N.** 1980. Ocorrência de algas cianofíceas em dois solos do Município de Piracicaba. *O Solo* 72: 62-64.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M.** 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology* 46: 39-50.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M.M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M.** 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research* 47:189-197.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.** 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex

- Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 873-879.
- Reynolds, C.S. & Jaworski, G.H.M.** 1978. Enumeration of natural *Microcystis* populations. *Br. Phycol. J.* 13: 269-277.
- Reynolds, C.S., Jaworski, H.M., Cmiech, H.A. & Leedale, G.F.** 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 293: 419-477.
- Rippka, R.** 1998. Isolation and purification of Cyanobacteria, p. 3-27. *In*: L. Packer & A.N. Glazer (eds.). *Methods in Enzymology*, Volume 167 Cyanobacteria. Academic Press, Inc., San Diego, 915 p.
- Sandes, M.A.L.** 1998. Estudos Ecológicos em Florescimento de *Microcystis* (Cyanobacteria - Cyanophyceae) e Interações com a Flora Bacteriana na Represa de Barra Bonita - Médio Tietê/SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 242 p.
- Sant'Anna, C.L. & Azevedo, M.T.P.** 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71: 359-385.
- Stein, J.R.** 1973. *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 448 p.
- Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S. & Hage, E.** 1993. Gastroenteritis Epidemic in the Area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO* 27: 244-253.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60: 407-438.
- Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y. & Corrêa, B.** 2003. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 42: 709-713.
- Watanabe, M.** 1996. Isolation, cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. *In*: M.F. Watanabe, K-I. Harada, W.W. Carmichael & H. Fujiki (eds.). *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 13-34
- Wilmotte, A. & Herdman, M.** 2001. Phylogenetic Relationships Among the Cyanobacteria Based on 16S rRNA Sequences. *In*: D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition – Volume One, The *Archaea* and The Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. Springer-Verlag, United States of America, pp. 487-493.
- Yunes, J.S.; Matthiensen, A., Parise, M., Salomon, P.S., Raggett, S.L., Beattie, K.A. & Codd, G.A.** 1998. *Microcystis aeruginosa* growth stages and the occurrence of microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. *In*: Reguera *et al.* (eds.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 18-21.
- Zagatto, P.A. & Aragão, M.A.** 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico, 23p. mais anexo.
- Zehnder, A.** 1985. Isolation and cultivation of large cyanophytes for taxonomic purposes. *Algological Studies* 38/39: 281-289.



## ANEXO

Tabela 1. Análise de comparação entre médias (teste-t) para amostras independentes, diâmetro celular na cepa SPC522 e amostra da natureza Reservatório de Americana (26.02.98).

|                                           | Média grupo 1 | Média grupo2 | Valor- t | Graus de liberdade | P     |
|-------------------------------------------|---------------|--------------|----------|--------------------|-------|
| VAR1(522) vs.VAR2<br>(Americana 26.02.08) | 5,356         | 5,463        | -1,545   | 98                 | 0,125 |

Tabela 2. Análise de comparação entre médias (teste-t) para amostras independentes, envelope mucilaginoso na cepa SPC522 e amostra da natureza Reservatório de Americana (26.02.98). Em negrito, valores significativos.

|                                           | Média grupo 1 | Média grupo2 | Valor- t | Graus de liberdade | P            |
|-------------------------------------------|---------------|--------------|----------|--------------------|--------------|
| VAR1(522) vs.VAR2<br>(Americana 26.02.08) | 7,801         | 5,773        | 3,276    | 98                 | <b>0,001</b> |

Tabela 3. Taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) de *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                                 | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | $0,032 \pm 0,038$                  | $0,080 \pm 0,015$ | $0,072 \pm 0,043$ | $0,066 \pm 0,013$ |
| 13,89                                                         | $0,148 \pm 0,056$                  | $0,239 \pm 0,024$ | $0,261 \pm 0,017$ | $0,406 \pm 0,018$ |
| 27,62                                                         | $0,163 \pm 0,050$                  | $0,348 \pm 0,041$ | $0,462 \pm 0,037$ | $0,585 \pm 0,030$ |
| 43,16                                                         | $0,217 \pm 0,035$                  | $0,400 \pm 0,013$ | $0,482 \pm 0,017$ | $0,611 \pm 0,005$ |
| 55,52                                                         | $0,176 \pm 0,015$                  | $0,423 \pm 0,013$ | $0,493 \pm 0,026$ | $0,610 \pm 0,018$ |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=3.Tabela 4. Análise de variância bifatorial das taxas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* SPC522 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30  $^{\circ}\text{C}$ ) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F      | P             |
|-----------------------------------|--------------------|--------|---------------|
| Temperatura                       | 3                  | 280,83 | <b>0,0000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 328,51 | <b>0,0000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 18,71  | <b>0,0000</b> |

Tabela 5. Diâmetros celulares ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                                 | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | $5,596 \pm 0,302$                  | $5,711 \pm 0,363$ | $5,465 \pm 0,303$ | $5,364 \pm 0,253$ |
| 13,89                                                         | $5,768 \pm 0,361$                  | $5,747 \pm 0,299$ | $5,366 \pm 0,387$ | $5,214 \pm 0,258$ |
| 27,62                                                         | $5,655 \pm 0,337$                  | $5,377 \pm 0,407$ | $5,499 \pm 0,356$ | $4,998 \pm 0,338$ |
| 43,16                                                         | $5,547 \pm 0,314$                  | $5,252 \pm 0,278$ | $5,402 \pm 0,341$ | $5,486 \pm 0,356$ |
| 55,52                                                         | $5,640 \pm 0,326$                  | $5,107 \pm 0,281$ | $5,033 \pm 0,324$ | $5,122 \pm 0,502$ |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=50.Tabela 6. Variação do diâmetro celular ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) |           |           |           |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                                               | 15                                 | 20        | 25        | 30        |
| 2,56                                                          | 5,1 - 6,4                          | 4,9 - 6,3 | 4,9 - 6,2 | 4,9 - 6,1 |
| 13,89                                                         | 4,7 - 6,5                          | 5,3 - 6,3 | 4,4 - 6,3 | 4,8 - 6,0 |
| 27,62                                                         | 4,8 - 6,3                          | 4,4 - 6,3 | 4,7 - 6,3 | 4,3 - 6,1 |
| 43,16                                                         | 4,9 - 6,3                          | 4,6 - 5,8 | 4,8 - 6,1 | 4,8 - 6,4 |
| 55,52                                                         | 5,1 - 6,4                          | 4,3 - 5,7 | 4,4 - 5,7 | 4,2 - 6,1 |

Tabela 7. Análise de variância bifatorial dos diâmetros celulares de *Microcystis aeruginosa* SPC522 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30 °C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F     | P             |
|-----------------------------------|--------------------|-------|---------------|
| Temperatura                       | 3                  | 63,38 | <b>0,0000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 27,48 | <b>0,0000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 13,83 | <b>0,0000</b> |

Tabela 8. Espessuras do envelope mucilaginoso ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)   |                    |                    |                    |
|---------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                                               | 15                 | 20                 | 25                 | 30                 |
| 2,56                                                          | 4,905 $\pm$ 1,430  | 4,934 $\pm$ 1,158  | 6,249 $\pm$ 3,377  | 13,398 $\pm$ 6,328 |
| 13,89                                                         | 9,517 $\pm$ 3,398  | 9,951 $\pm$ 4,412  | 7,796 $\pm$ 3,465  | 9,599 $\pm$ 4,431  |
| 27,62                                                         | 13,535 $\pm$ 6,081 | 11,113 $\pm$ 5,325 | 8,003 $\pm$ 4,047  | 9,913 $\pm$ 4,202  |
| 43,16                                                         | 12,192 $\pm$ 5,051 | 10,016 $\pm$ 5,063 | 13,089 $\pm$ 6,108 | 10,503 $\pm$ 6,312 |
| 55,52                                                         | 13,257 $\pm$ 6,792 | 10,136 $\pm$ 5,267 | 10,682 $\pm$ 4,973 | 13,291 $\pm$ 8,884 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=50.

Tabela 9. Variação das espessuras do envelope mucilaginoso ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis aeruginosa* SPC522 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C) |            |            |            |
|---------------------------------------------------------------|------------------|------------|------------|------------|
|                                                               | 15               | 20         | 25         | 30         |
| 2,56                                                          | 2,6 - 10,2       | 2,6 - 8,2  | 2,0 - 16,5 | 4,7 - 36,0 |
| 13,89                                                         | 3,7 - 19,1       | 3,5 - 21,8 | 3,9 - 20,4 | 3,4 - 22,9 |
| 27,62                                                         | 3,4 - 29,2       | 4,2 - 22,4 | 2,2 - 23,0 | 3,9 - 24,1 |
| 43,16                                                         | 3,6 - 23,0       | 4,3 - 25,8 | 4,2 - 31,2 | 3,1 - 38,6 |
| 55,52                                                         | 4,3 - 32,4       | 3,1 - 28,4 | 4,1 - 28,6 | 3,4 - 43,8 |

Tabela 10. Análise de variância bifatorial das espessuras do envelope mucilaginoso de *Microcystis aeruginosa* SPC522 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30 °C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F      | P             |
|-----------------------------------|--------------------|--------|---------------|
| Temperatura                       | 3                  | 11,195 | <b>0,0000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 25,588 | <b>0,0000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 10,441 | <b>0,0000</b> |

Tabela 11. Análise de comparação entre médias (teste-t) para amostras independentes, diâmetro celular na cepa SPC702 e amostra da natureza Lago das Garças (20.10.99). Em negrito, valores significativos.

|                                         | Média grupo 1 | Média grupo2 | Valor- t | Graus de liberdade | P             |
|-----------------------------------------|---------------|--------------|----------|--------------------|---------------|
| VAR1(702) vs. VAR2<br>(Garças 20.10.99) | 4,113         | 4,239        | -2,404   | 98                 | <b>0,0181</b> |

Tabela 12. Análise de comparação entre médias (teste-t) para amostras independentes, envelope mucilaginoso na cepa SPC702 e amostra da natureza Lago das Garças (20.10.99).

|                                         | Média grupo 1 | Média grupo2 | Valor- t | Graus de liberdade | P      |
|-----------------------------------------|---------------|--------------|----------|--------------------|--------|
| VAR1(702) vs. VAR2<br>(Garças 20.10.99) | 1,845         | 1,600        | 1,408    | 98                 | 0,1624 |

Tabela 13. Taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) de *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)     |                     |                     |                     |
|---------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                                               | 15                   | 20                  | 25                  | 30                  |
| 2,56                                                          | 0,0969 $\pm$ 0,0101  | 0,0798 $\pm$ 0,0115 | 0,0809 $\pm$ 0,0118 | 0,0788 $\pm$ 0,0199 |
| 13,89                                                         | -0,0037 $\pm$ 0,0039 | 0,1932 $\pm$ 0,0169 | 0,2710 $\pm$ 0,0163 | 0,2394 $\pm$ 0,0318 |
| 27,62                                                         | 0,0122 $\pm$ 0,0261  | 0,2346 $\pm$ 0,0079 | 0,3387 $\pm$ 0,0274 | 0,3633 $\pm$ 0,0262 |
| 43,16                                                         | 0,0466 $\pm$ 0,0247  | 0,2371 $\pm$ 0,0015 | 0,3171 $\pm$ 0,0285 | 0,3689 $\pm$ 0,0270 |
| 55,52                                                         | 0,0585 $\pm$ 0,0148  | 0,2400 $\pm$ 0,0216 | 0,3757 $\pm$ 0,0040 | 0,3865 $\pm$ 0,0190 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

Tabela 14. Análise de variância bifatorial das taxas de crescimento de *Microcystis panniformis* SPC702 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F      | P            |
|-----------------------------------|--------------------|--------|--------------|
| Temperatura                       | 3                  | 496,16 | <b>0,000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 166,27 | <b>0,000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 39,12  | <b>0,000</b> |

Tabela 15. Diâmetros celulares ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)  |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | 4,050 $\pm$ 0,223 | 4,022 $\pm$ 0,215 | 3,945 $\pm$ 0,286 | 4,121 $\pm$ 0,318 |
| 13,89                                                         | 4,250 $\pm$ 0,316 | 4,048 $\pm$ 0,230 | 3,976 $\pm$ 0,265 | 4,075 $\pm$ 0,254 |
| 27,62                                                         | 4,189 $\pm$ 0,293 | 4,145 $\pm$ 0,265 | 3,987 $\pm$ 0,250 | 4,094 $\pm$ 0,312 |
| 43,16                                                         | 4,229 $\pm$ 0,300 | 4,062 $\pm$ 0,259 | 4,010 $\pm$ 0,221 | 4,136 $\pm$ 0,237 |
| 55,52                                                         | 4,275 $\pm$ 0,270 | 4,124 $\pm$ 0,278 | 3,974 $\pm$ 0,218 | 4,128 $\pm$ 0,267 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=50.

Tabela 16. Variação do diâmetro celular ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C) |           |           |           |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                                               | 15               | 20        | 25        | 30        |
| 2,56                                                          | 3,5 - 4,5        | 3,6 - 4,4 | 3,4 - 4,5 | 3,4 - 4,7 |
| 13,89                                                         | 3,5 - 4,8        | 3,4 - 4,5 | 3,4 - 4,5 | 3,5 - 4,6 |
| 27,62                                                         | 3,6 - 4,9        | 3,8 - 4,8 | 3,4 - 4,5 | 3,4 - 4,7 |
| 43,16                                                         | 3,6 - 4,9        | 3,6 - 4,7 | 3,4 - 4,5 | 3,6 - 4,6 |
| 55,52                                                         | 3,6 - 4,8        | 3,6 - 4,6 | 3,5 - 4,3 | 3,5 - 4,7 |

Tabela 17. Análise de variância bifatorial dos diâmetros celulares de *Microcystis panniformis* SPC702 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F     | P             |
|-----------------------------------|--------------------|-------|---------------|
| Temperatura                       | 3                  | 29,22 | <b>0,0000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 3,43  | <b>0,0085</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 1,64  | 0,0760        |

Tabela 18. Espessuras do envelope mucilaginoso ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)  |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | 3,839 $\pm$ 0,935 | 3,448 $\pm$ 1,100 | 3,079 $\pm$ 1,032 | 3,732 $\pm$ 1,479 |
| 13,89                                                         | 7,171 $\pm$ 2,982 | 2,746 $\pm$ 1,106 | 1,089 $\pm$ 0,607 | 1,668 $\pm$ 0,713 |
| 27,62                                                         | 5,634 $\pm$ 1,835 | 2,380 $\pm$ 1,093 | 1,485 $\pm$ 0,602 | 1,742 $\pm$ 0,739 |
| 43,16                                                         | 4,991 $\pm$ 1,954 | 2,392 $\pm$ 1,177 | 2,319 $\pm$ 1,149 | 1,855 $\pm$ 0,646 |
| 55,52                                                         | 4,667 $\pm$ 1,864 | 2,203 $\pm$ 0,966 | 2,441 $\pm$ 1,020 | 2,270 $\pm$ 1,081 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=50.

Tabela 19. Variação das espessuras do envelope mucilaginoso ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis panniformis* SPC702 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C) |           |           |             |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------|-----------|-------------|
|                                                               | 15               | 20        | 25        | 30          |
| 2,56                                                          | 1,6 - 6,1        | 0,0 - 5,8 | 0,9 - 6,2 | 0,0 - 6,9   |
| 13,89                                                         | 1,8 - 15,7       | 0,0 - 5,1 | 0,0 - 2,0 | 0,0 - 3,2 - |
| 27,62                                                         | 2,0 - 9,9        | 0,0 - 4,6 | 0,0 - 2,3 | 0,0 - 3,3   |
| 43,16                                                         | 1,6 - 10,5       | 0,0 - 5,3 | 0,0 - 5,3 | 0,0 - 3,7   |
| 55,52                                                         | 1,5 - 11,1       | 0,0 - 4,4 | 0,0 - 6,3 | 0,0 - 4,6   |

Tabela 20. Análise de variância bifatorial das espessuras do envelope mucilaginoso de *Microcystis panniformis* SPC702 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F      | P             |
|-----------------------------------|--------------------|--------|---------------|
| Temperatura                       | 3                  | 312,51 | <b>0,0000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 9,79   | <b>0,0000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 26,64  | <b>0,0000</b> |

Tabela 21. Análise de comparação entre médias (teste-t) para amostras independentes, diâmetro celular na cepa SPC855 e fonte de inóculo Pesqueiro 04. Em negrito, valor significativo.

|                                   | Média grupo 1 | Média grupo 2 | Valor- t | Graus de liberdade | P             |
|-----------------------------------|---------------|---------------|----------|--------------------|---------------|
| VAR1(855) vs. VAR2 (Pesqueiro 04) | 4,724         | 6,720         | -25,069  | 98                 | <b>0,0000</b> |

Tabela 22. Taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) de *Microcystis wesenbergii* SPC771 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)  |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | 0,023 $\pm$ 0,093 | 0,116 $\pm$ 0,017 | 0,103 $\pm$ 0,038 | 0,081 $\pm$ 0,028 |
| 13,89                                                         | 0,165 $\pm$ 0,013 | 0,241 $\pm$ 0,042 | 0,271 $\pm$ 0,052 | 0,312 $\pm$ 0,013 |
| 27,62                                                         | 0,192 $\pm$ 0,032 | 0,343 $\pm$ 0,049 | 0,404 $\pm$ 0,042 | 0,398 $\pm$ 0,039 |
| 43,16                                                         | 0,216 $\pm$ 0,018 | 0,370 $\pm$ 0,034 | 0,409 $\pm$ 0,024 | 0,452 $\pm$ 0,048 |
| 55,52                                                         | 0,204 $\pm$ 0,023 | 0,370 $\pm$ 0,034 | 0,442 $\pm$ 0,039 | 0,470 $\pm$ 0,021 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ .

Tabela 23. Análise de variância bifatorial das taxas de crescimento de *Microcystis wesenbergii* SPC771 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F      | P            |
|-----------------------------------|--------------------|--------|--------------|
| Temperatura                       | 3                  | 66,70  | <b>0,000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 115,11 | <b>0,000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 2,91   | <b>0,006</b> |

Tabela 24. Diâmetros celulares ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis wesenbergii* SPC771 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)  |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                               | 15                | 20                | 25                | 30                |
| 2,56                                                          | 5,492 $\pm$ 0,400 | 5,549 $\pm$ 0,316 | 5,714 $\pm$ 0,283 | 5,425 $\pm$ 0,273 |
| 13,89                                                         | 6,051 $\pm$ 0,386 | 5,714 $\pm$ 0,336 | 5,973 $\pm$ 0,285 | 5,701 $\pm$ 0,320 |
| 27,62                                                         | 6,015 $\pm$ 0,374 | 5,836 $\pm$ 0,348 | 5,945 $\pm$ 0,277 | 5,730 $\pm$ 0,387 |
| 43,16                                                         | 5,876 $\pm$ 0,340 | 5,716 $\pm$ 0,392 | 5,916 $\pm$ 0,358 | 5,693 $\pm$ 0,283 |
| 55,52                                                         | 5,796 $\pm$ 0,367 | 5,914 $\pm$ 0,314 | 5,867 $\pm$ 0,289 | 5,775 $\pm$ 0,355 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão,  $n=50$ .

Tabela 25. Variação dos diâmetros celulares ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis wesenbergii* SPC771 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C) |           |           |           |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                                               | 15               | 20        | 25        | 30        |
| 2,56                                                          | 4,7 - 6,6        | 5,1 - 6,3 | 5,2 - 6,3 | 4,7 - 6,2 |
| 13,89                                                         | 5,4 - 7,1        | 5,2 - 6,5 | 5,3 - 6,5 | 4,8 - 6,3 |
| 27,62                                                         | 5,4 - 6,8        | 5,3 - 6,7 | 5,4 - 6,6 | 5,1 - 6,8 |
| 43,16                                                         | 5,1 - 6,5        | 4,9 - 6,6 | 5,3 - 7,2 | 5,2 - 6,4 |
| 55,52                                                         | 5,2 - 6,6        | 5,3 - 6,7 | 5,4 - 6,6 | 4,9 - 6,5 |



Tabela 26. Análise de variância bifatorial dos diâmetros celulares de *Microcystis wesenbergii* SPC771 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F            | P            |
|-----------------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| Temperatura                       | 3                  | <b>21,53</b> | <b>0,000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | <b>33,25</b> | <b>0,000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | <b>3,37</b>  | <b>0,000</b> |

Tabela 27. Espessuras do envelope mucilaginoso externo difluente ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis wesenbergii* SPC771 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C)   |                     |                     |                     |
|---------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                                               | 15                 | 20                  | 25                  | 30                  |
| 2,56                                                          | 8,656 $\pm$ 4,570  | 7,862 $\pm$ 3,539   | 6,659 $\pm$ 3,936   | 8,799 $\pm$ 4,197   |
| 13,89                                                         | 10,922 $\pm$ 5,068 | 11,031 $\pm$ 6,879  | 9,867 $\pm$ 4,007   | 18,236 $\pm$ 9,091  |
| 27,62                                                         | 9,269 $\pm$ 4,488  | 9,502 $\pm$ 4,403   | 25,428 $\pm$ 15,908 | 24,036 $\pm$ 13,016 |
| 43,16                                                         | 9,905 $\pm$ 3,824  | 10,877 $\pm$ 4,395  | 25,775 $\pm$ 15,107 | 23,817 $\pm$ 13,805 |
| 55,52                                                         | 9,405 $\pm$ 3,043  | 19,582 $\pm$ 14,335 | 26,662 $\pm$ 15,393 | 18,983 $\pm$ 14,613 |

Os valores representados são média  $\pm$  desvio padrão, n=50.

Tabela 28. Variação das espessuras do envelope mucilaginoso ( $\mu\text{m}$ ) de *Microcystis wesenbergii* SPC771 no gradiente-cruzado de irradiância e temperatura.

| Irradiância<br>( $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Temperatura (°C) |            |            |            |
|---------------------------------------------------------------|------------------|------------|------------|------------|
|                                                               | 15               | 20         | 25         | 30         |
| 2,56                                                          | 2,9 - 23,5       | 3,4 - 17,6 | 2,5 - 21,4 | 3,7 - 21,6 |
| 13,89                                                         | 5,9 - 34,9       | 3,2 - 37,3 | 4,7 - 22,4 | 4,8 - 16,0 |
| 27,62                                                         | 3,8 - 25,9       | 3,5 - 29,4 | 2,4 - 75,3 | 6,0 - 55,4 |
| 43,16                                                         | 3,6 - 29,7       | 3,3 - 34,6 | 3,3 - 72,6 | 4,9 - 65,0 |
| 55,52                                                         | 4,8 - 23,8       | 2,7 - 64,4 | 2,1 - 67,4 | 4,9 - 74,4 |

Tabela 29. Análise de variância bifatorial das espessuras do envelope mucilaginoso externo difluente de *Microcystis wesenbergii* SPC771 em diferentes condições de temperatura (15/20/25/30°C) e irradiância (2,56/13,89/27,62/43,16/55,52  $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Em negrito, valores significativos ( $p < 0,05$ ).

| Efeito                            | Graus de liberdade | F     | P            |
|-----------------------------------|--------------------|-------|--------------|
| Temperatura                       | 3                  | 62,62 | <b>0,000</b> |
| Irradiância                       | 4                  | 43,63 | <b>0,000</b> |
| Interação temperatura/irradiância | 12                 | 13,88 | <b>0,000</b> |