



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**MAIARA TÁBATHA DA SILVA BRITO**

**INFLUÊNCIA DO pH E CARBONO INORGÂNICO NA COMPETIÇÃO ENTRE AS**  
**CIANOBACTÉRIAS *Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa***

**RECIFE**

**2017**

**MAIARA TÁBATHA DA SILVA BRITO**

**INFLUÊNCIA DO pH E CARBONO INORGÂNICO NA COMPETIÇÃO ENTRE AS  
CIANOBACTÉRIAS *Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

**Orientador:** Dr. Renato José Reis Molica

**RECIFE**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B862i Brito, Maiara Tábatha da Silva  
Influência do pH e carbono inorgânico na competição entre as  
cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis*  
*aeruginosa* / Maiara Tábatha da Silva Brito. – 2017.  
58 f.: il.

Orientador: Renato José Reis Molica.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Recife,  
BR-PE, 2017.

Inclui referências e anexo(s).

1. Ecologia de cianobactérias 2. Florações 3. Mudanças  
climáticas 4. CO2 I. Molica, Renato José Reis, orient. II. Título

CDD 574.5

INFLUÊNCIA DO pH E CARBONO INORGÂNICO NA COMPETIÇÃO ENTRE AS  
CIANOBACTÉRIAS *Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Dissertação apresentada no dia 20 de Fevereiro de 2017.

**Orientador:**

---

Prof. Dr. Renato José Reis Molica (UFRPE)

**Examinadores:**

---

Profa. Dra. Ariadne do Nascimento Moura (UFRPE)

---

Profa. Dra. Vanessa Becker (UFRN)

---

Profa. Dra. Mariana Guenther (UPE)

**Suplente:**

---

Dra. Nísia Karine Cavalcanti Aragão-Tavares (UFRPE/DB)

*Dedicatória*

*Aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

v

Agradeço imensamente à Deus, por todas as dádivas a mim concedidas que me permitiram chegar ao fim desta caminhada. Deus é bom o tempo todo!!!

Agradeço à minha família por todo Amor e apoio. Muito obrigada pai, mãe, irmã, avós ...

Ao meu companheiro de caminhada, Silvano, por toda paciência e Amor ao longo da nossa jornada acadêmica. Obrigada por ter acreditado “por nós dois” que eu conseguiria. Obrigada Amor!

À Jamily e Luana por me acolherem e terem se tornado fiéis companheiras. Saudades da nossa casa!

À tio Nilton, tia Luiza, Pedro, Emília e Ewerton, por todo apoio em Recife.

Ao meu orientador Molica, por confiar que eu seria capaz de concluir este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos e pela paciência.

À Unidade Acadêmica de Garanhuns, em especial aos amigos do Laboratório de Biotecnologia do CENLAG (Central de Laboratórios) por tornarem os meus dias mais alegres e estarem sempre dispostos a me ajudar. Obrigada a todos!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, aos professores e colegas de turma pelos conhecimentos compartilhados.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

vi

1. RESUMO.....	8
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
4. HIPÓTESE.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17
ARTIGO	24
Influência do pH e carbono inorgânico na competição entre as cianobactérias <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i> .	
1. Resumo.....	25
2. Introdução.....	26
3. Métodos.....	28
3.1	Condições de28
cultivo.....	
3.2 Desenho experimental e acompanhamento dos cultivos.....	29
3.3 Parâmetros abióticos.....	29
3.4 Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	30
4.1 Crescimento e rendimento.....	30
4.2 pH, alcalinidade e carbono inorgânico.....	32
5. Discussão.....	33
6. Agradecimentos.....	38
7. Referências.....	38
8. Tabelas.....	45
9. Figuras.....	48
ANEXO.....	55

Brito, Maiara Tábatha da Silva. M.Sc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro 2017. Influência do pH e carbono inorgânico na competição entre as cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Orientador: Renato José Reis Molica.

## RESUMO

Florações de cianobactérias em ambientes límnicos são associadas principalmente ao enriquecimento nutricional dos mananciais porém, atualmente, altas concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) atmosférico também vem favorecendo sua dominância. Durante a floração, o consumo de  $\text{CO}_2$  livre e de nutrientes elevam o pH das águas. Assim, ao se difundir na água o  $\text{CO}_2$  atmosférico torna-se disponível como bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e/ou carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), promovendo mudanças na comunidade fitoplanctônica devido a vantagem competitiva que algumas espécies apresentam no uso do  $\text{HCO}_3^-$ . *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* são cianobactérias amplamente distribuídas nos ecossistemas aquáticos dulciaquícolas, formadoras de florações e conhecidas por fazer uso do  $\text{HCO}_3^-$ . Este estudo foi realizado a fim de investigar a relação competitiva entre estas espécies diante de mudanças no pH e disponibilidade de carbono inorgânico. Foram realizados cultivos com e sem aeração, com e sem adição de bicarbonato e em três diferentes condições de pH (livre, 6,8 e 8,2) com as cepas ITEP-A1 de *C. raciborskii* e NPLJ-4 de *M. aeruginosa*. Os cultivos iniciaram-se com o mesmo biovolume e tiveram a sua fase de crescimento exponencial estendida a partir de reinoculação em novo meio de cultura (retornando ao biovolume inicial). Para os cultivos mistos considerou-se a espécie com o menor crescimento. As taxas de crescimento ( $\mu\text{.dia}^{-1}$ ) e rendimento das espécies, o pH, alcalinidade e carbono inorgânico dos cultivos foram avaliados por ANOVA Fatorial de medidas repetidas. Isoladamente, *M. aeruginosa* apresentou maiores taxas de crescimento em pH 8,2 e livre, e crescimento reduzido em pH 6,8, enquanto *C. raciborskii* não foi influenciada pelo pH. Ambas as espécies promoveram mudanças significativas no pH nos cultivos não tamponados (pH livre). A aeração e o bicarbonato foram fatores determinantes para a resposta das espécies nos cultivos em competição. Nos cultivos não tamponados, com aeração e sem adição de bicarbonato *C. raciborskii* foi melhor competidora que *M. aeruginosa*, enquanto que esta foi melhor competidora nos cultivos sem aeração e com adição de bicarbonato. Foi possível constatar mudanças nas respostas competitivas das espécies diante de alterações no pH e alcalinidade e,



consequentemente, das proporções de carbono inorgânico dissolvido. Assim, com o aumento da eutrofização dos ecossistemas aquáticos associado a um aumento da alcalinidade e pH, mudanças nas relações competitivas das espécies estão propensas a ocorrer, visto que o alívio da limitação por carbono inorgânico pode favorecer a dominância de cianobactérias potencialmente tóxicas como as do gênero *Microcystis*.

**Palavras-chave:** Ecologia de cianobactérias, Florações, Mudanças climáticas; CO<sub>2</sub>.

Brito, Maiara Tábatha da Silva. M.Sc. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). February, 2017. Influence of pH and inorganic carbon on competition between cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*. Supervisor: Renato José Reis Molica.

## ABSTRACT

Cyanobacterial bloom in freshwater are mainly associated with the nutritional enrichment of the water, but currently, high concentration of atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is also favoring its dominance. During bloom, the consumption of free CO<sub>2</sub> and nutrients increases the pH of the water. Thus, when it diffuses in water, atmospheric CO<sub>2</sub> becomes available as bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), promoting changes in the phytoplankton community due to the competitive advantage that some species present in use of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* are cyanobacteria widely distributed in freshwater aquatic ecosystems, bloom forming and known to make use of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. This study was carried out in order to investigate the competitive relationship between these species due to changes in pH and availability of inorganic carbon. Were performed cultures with and without aeration, with and without bicarbonate and in three different pH conditions (free, 6.8 and 8.2) with the strains ITEP-A1 of *C. raciborskii* and NPLJ4 of *M. aeruginosa*. Cultures started with the same biovolume and had their exponential growth phase extended from reinoculation into new culture medium (returning to the initial biovolume). For the mixed cultures the species with the lowest growth was considered. The growth rates (μ.day<sup>-1</sup>) and species yield, pH, alkalinity and inorganic carbon of the cultures were evaluated by repeated measures ANOVA. Isolate *M. aeruginosa* presented higher growth rates at pH 8.2 and free, and reduced growth at pH 6.8 while *C. raciborskii* was not influenced by pH. Both species promoted significant changes in pH in the non-buffered cultures (free pH). Aeration and bicarbonate were determinant factors for the response of the species in the competition cultures. In non-buffered cultures, with aeration and without addition of bicarbonate *C. raciborskii* was better competitor than *M. aeruginosa*, whereas this was best competitor in the cultures without aeration and with addition of bicarbonate. It was possible to observe changes in the competitive responses of the species to changes in pH and alkalinity and, consequently, to the proportions of dissolved inorganic carbon. Thus, with increased eutrophication of aquatic ecosystems associated with increased alkalinity and pH, changes in the competitive

relationships of species are likely to occur, since the relief of inorganic carbon limitation may favor the dominance of potentially toxic cyanobacteria such as those of the genus *Microcystis*.

**Key-words:** Cyanobacterial ecology, Blooms, Climate change; CO<sub>2</sub>.

## INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias são procariotos fotossintetizantes que ao longo do seu processo evolutivo se consolidaram como uma parcela chave da produção primária e do fluxo de energia de ecossistemas aquáticos continentais (CHORUS; BARTRAM, 1999; FERRÃO-FILHO et al., 2009). Com grande diversidade funcional, possuem estratégias de vida que lhes asseguram a sobrevivência em diferentes condições ambientais, sendo capazes de ocupar variados nichos e apresentar vantagens competitivas sobre outros grupos da comunidade fitoplanctônica (PADISÁK, 1997; CARMICHAEL, et al., 2001; BURFORD; DAVIS, 2011; ARAGÃO-TAVARES et al., 2013; IBELINGS et al., 2014). Nas últimas décadas, a ocorrência de eventos de florações de cianobactérias, principalmente com espécies potencialmente tóxicas, vem se tornando um problema recorrente em grandes reservatórios de abastecimento público de todo o mundo, sendo responsáveis por causar prejuízos ambientais e sociais (CARMICHAEL et al., 2001; HOLLAND; KINNEAR 2013; IBELINGS et al., 2014).

Dentre as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas mais comuns em florações de ecossistemas límnicos estão *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing. *Cylindrospermopsis raciborskii* têm se destacado nas últimas décadas devido a um aumento nos registros de expansão da sua área de ocorrência (BRIAND et al., 2004; BONILLA et al., 2012; SINHA et al., 2012). Representante da ordem Nostocales, esta espécie é conhecida por formar florações, pela capacidade de produzir toxinas (saxitoxinas e cilindrospermopsina), de fixar nitrogênio atmosférico, estocar e otimizar o uso do fósforo e sobressair-se em condições de baixa luminosidade (PADISÁK, 1997; BURFORD; DAVIS, 2011; KOMÁREK et al., 2014). Apesar de ter se propagado de regiões tropicais e subtropicais para áreas temperadas (PADISÁK, 1997) nas últimas décadas, relatos de floração de *C. raciborskii* vêm tornando-se cada vez mais frequentes nas mais diversas regiões (BOUVY et al., 2001; RYAN et al., 2003; SAKER et al., 2003; BRIAND et al., 2004; BERGER et al., 2006; KOKOCIŃSKI et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2013). *Microcystis aeruginosa* por sua vez, representante da ordem Chroococcales, é considerada uma das cianobactérias de maior ocorrência e abundância em ecossistemas eutróficos, além de ser responsável por grandes prejuízos ambientais e de saúde pública, devido a sua capacidade de produzir uma das mais frequentes cianotoxinas encontradas em florações de ecossistemas aquáticos continentais, a microcistina

(CHORUS; BARTRAM, 1999; CARMICHAEL, et al., 2001; KANEKO et al., 2007; KARDINAAL et al., 2007; BÁSCI et al., 2013).

A depender da associação de diferentes fatores abióticos e das habilidades competitivas das cianobactérias, as florações podem ocorrer com a dominância de uma única espécie ou podem ser constituídas por duas ou mais espécies capazes de coexistir, podendo ainda apresentar um padrão de flutuação sazonal com substituição de espécies (COSTA et al., 2006; LAMPERT; SOMMER, 2007; CHELLAPPA et al., 2008, MOURA et al. 2015).

Assim como as plantas superiores, as espécies fitoplanctônicas interagem de forma direta e indireta competindo por recurso, em um processo fortemente influenciado pelo sinergismo de diversos fatores ambientais (GUBIANE, 2007). Como consequência desta competição, as espécies podem apresentar diminuição no seu crescimento ou sobrevivência (BEGON et al., 2007) pois, embora possa haver sobreposição de nicho fundamental, apenas uma espécie pode ocupar um nicho realizado (LAMPERT; SOMMER, 2007). Deste modo, caso duas espécies estejam competindo por um mesmo recurso, será melhor competidora aquela que conseguir levar o recurso à sua menor densidade de equilíbrio (TILMAN, 1982). Alguns estudos experimentais de competição já observaram que, independente da densidade populacional inicial, a espécie que apresente menor requerimento pelo recurso ( $K_{0,5}$ ), mantendo-o em sua menor densidade de equilíbrio, será melhor competidora (TILMAN, 1982; RZYMSKI et al., 2014).

Estas respostas competitivas que determinam a composição das florações, são governadas por mudanças em diversos parâmetros ambientais, como por exemplo o enriquecimento nutricional dos mananciais, que é capaz de aliviar a limitação de nitrogênio e fósforo. Além do processo de eutrofização, outros fatores responsáveis por promover a dominância das cianobactérias são o aumento da temperatura e mudanças nos regimes de precipitação, o qual eleva o tempo de residência da água, promovendo a estabilidade e estratificação da coluna d'água (CHORUS; BARTRAM, 1999; MCGREGOR; FABBRO, 2000; MOLICA; AZEVEDO 2009; HOLLAND; KINNEAR, 2013; IBELINGS et al., 2014). Somado a tais fatores, estudos recentes têm destacado que as mudanças climáticas globais podem ser um fator determinante sobre a dominância das cianobactérias (HOLLAND et al. 2012; SINHA et al., 2012; MANTZOUKI et al., 2015).

Segundo dados da Divisão de Monitoramento Global nos Estados Unidos (NOAA/ESRL), os níveis de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) na atmosfera terrestre estão atingindo níveis alarmantes de 400,8 ppm. Este aumento, somado a elevadas temperaturas e ao processo de eutrofização dos corpos d'água, é responsável por proporcionar condições ótimas para o desenvolvimento das cianobactérias (HOLLAND et al., 2012; SANDRINI et al., 2014),

refletindo um futuro preocupante no que se trata do aumento dos eventos de florações destes microrganismos (QIU; GAO, 2002; HOLLAND et al., 2012; WU et al. 2012).

Apesar de muitos ecossistemas límnicos serem considerados supersaturados com carbono orgânico e, conseqüentemente, com carbono inorgânico (concentrações superiores a 1500 ppm), a atividade fotossintética em um evento de floração pode tornar esse ecossistema subsaturado ( $\cong 30$  ppm) em poucas horas (VISSER et al., 2016). De modo geral, densas florações elevam o consumo de  $\text{CO}_2$  livre, de nutrientes e, conseqüentemente, de prótons livres, aumentando o pH e tornando os ecossistemas fortemente alcalinos. Assim, à medida que ecossistemas aquáticos encontram-se subsaturados e os níveis de  $\text{CO}_2$  atmosféricos vem aumentando, ocorre o influxo do  $\text{CO}_2$  atmosférico para a água, tornando-se disponível principalmente nas formas de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (GIORDANO et al., 2005; VERSCHOOR et al., 2012; VISSER, et al., 2016).

Diante destas mudanças, a dinâmica das interações existente na comunidade fitoplanctônica pode ser alterada, sendo as espécies mais especialistas no uso do  $\text{CO}_2$  livre, substituídas por espécies mais especialistas no uso do carbono na forma de bicarbonato (MABERLY, 1996; VAN DE WAAL et al., 2011; SANDRINI et al., 2015). A base para esta versatilidade na utilização do carbono inorgânico por cianobactérias consiste num mecanismo chamado de Mecanismo de Concentração de Carbono (MCC), que as permite elevar as concentrações de  $\text{CO}_2$  em torno da enzima de carboxilação ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO) localizada nos carboxissomos, por meio do transporte ativo do bicarbonato (PRICE; BADGE 2003). Para cianobactérias, são conhecidos cinco sistemas envolvido na atividade do MCC, sendo dois sistemas de captação de  $\text{CO}_2$  livre (NDH-I<sub>3</sub> e NDH-I<sub>4</sub>) e três transportadores de bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$  (BCT1, *SbtA* e *BicA*) (HOLLAND et al., 2012; SANDRINI et al., 2014). Apesar de conseguirem captar tanto o  $\text{CO}_2$  quanto o  $\text{HCO}_3^-$ , apenas este último é utilizado nos carboxissomos, desta forma, o  $\text{CO}_2$  para ser metabolizado é transformado em  $\text{HCO}_3^-$  com o auxílio das anidrases carbônicas (PRICE et al., 2011; SANDRINI et al., 2014; BURNAP et al., 2015).

Com a possibilidade de utilizar tanto  $\text{CO}_2$  livre como  $\text{HCO}_3^-$  como recurso, cianobactérias passam a ter uma certa vantagem competitiva sobre os demais grupos fitoplanctônicos, visto que nem todas as algas eucarióticas possuem mecanismos para utilização do  $\text{HCO}_3^-$  (SANDRINI et al., 2016a). Desta forma, diante de limitações de  $\text{CO}_2$  livre, as cianobactérias são capazes de se aclimatar, modificar a expressão de um ou muitos genes que regulam estes mecanismos e, assim, continuar a crescer (BURNAP et al., 2015). Todas estas mudanças, apesar de demandarem um maior gasto energético, são válidas, pois

proporcionam vantagens competitivas no desempenho ecológico das espécies (GIORDANO et al., 2003; PRICE et al., 2011; HOLLAND et al., 2012; WU et al., 2012).

Devido à grande variedade de ecótipos existentes, diferentes cepas do gênero *Microcystis*, por exemplo, podem apresentar ambos os sistemas de captação de CO<sub>2</sub>, porém diferirem quanto à expressão dos genes que expressam os transportadores de bicarbonato (SANDRINI et al. 2014). Desta forma, devido às especificidades de afinidade e taxa de fluxo dos diferentes sistemas de MCC nas espécies que compõem um evento de floração, aquelas mais generalistas, que utilizam tanto CO<sub>2</sub> livre quanto bicarbonato, podem apresentar uma desvantagem competitiva em relação às aquelas especialistas no consumo de bicarbonato. Assim, com o aumento nas concentrações de carbono inorgânico dissolvido, pode ocorrer dominância de algumas espécies de cianobactérias, o que representa um risco à integridade dos ecossistemas límnicos (MABERLY, 1996; QIU; GAO 2002; PAERL 2012; VERSCHOOR et al., 2012, VERSPAGEN et al., 2014; PIERANGELINI et al., 2014).

Neste contexto, observa-se que o carbono inorgânico pode, sim, atuar como limitante ao crescimento de cianobactérias e vem deixando de fazê-lo em razão do atual cenário de aumento da emissão de dióxido de carbono para a atmosfera e consequente alcalinização dos ecossistemas aquáticos (VERSPAGEM et al. 2014; SANDRINI et al., 2015). Assim, torna-se necessário realizar investigações que busquem avaliar o impacto dessas mudanças nas proporções de carbono inorgânico dissolvido e dos fatores a este relacionados, tais como o pH e a alcalinidade, sobre as comunidades fitoplanctônicas, a fim de entender se as espécies responsáveis por florações tóxicas, por exemplo *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, podem ser beneficiadas de modo a ocorrer aumento e expansão de suas florações (REYNOLDS, 2006; WU et al., 2012).

## HIPÓTESE

- Sob pH alcalino e fonte de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), *Cylindrospermopsis raciborskii* é melhor competidora que *Microcystis aeruginosa*.

## OBJETIVOS

### *Objetivo Geral*

- Contribuir para o conhecimento das relações competitivas entre as espécies *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*.

### *Objetivo específico*

- Avaliar as relações competitivas entre as espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* cultivadas sob diferentes condições de pH e disponibilidade de carbono inorgânico.



## REFERÊNCIAS

AMMAR, M. et al. Initial growth phases of two bloom-forming cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*) in monocultures and mixed cultures depending on light and nutrient conditions. **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**, p. 231-240, 2014.

ANTUNES, J. T.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 473, 2015.

ARAGÃO-TAVARES, N. K. C.; MOURA, A. N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Planktonic Cyanobacteria forming blooms in reservoirs of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 4, p. 662-668, 2013.

BADGER, M. R.; PRICE, G. D. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 383, p. 609-622, 2003.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed Editora, 2009.

BERGER, C. et al. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake Guiers (Senegal, West Africa). **FEMS microbiology ecology**, v. 57, n. 3, p. 355-366, 2006.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. et al. Effects of toxic and non-toxic crude extracts on different *Microcystis* species (Cyanobacteria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2596-2600, 2013.

BONILLA, S. et al. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*?. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 594-607, 2012.

BOOPATHI, T.; KI, J. S. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. **Toxins**, v. 6, n. 7, p. 1951-1978, 2014.

BOUVY, M. et al. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 20, n. 3, p. 285-297, 1999.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 13-27, 2000.

BOUVY, M.; PAGANO, M.; TROUSSELLIER, M. Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 25, n. 3, p. 215-227, 2001.

BRIAND, J. F. et al. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming?. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.

BURFORD, M. A.; DAVIS, T. W. Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, n. 4, p. 883-891, 2011.

BURNAP, R. L.; HAGEMANN, M.; KAPLAN, A. Regulation of CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria. **Life**, v. 5, n. 1, p. 348-371, 2015.

CAREY, C. C. et al. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1394-1407, 2012.

CARMICHAEL, W. W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663, 2001.

CHISLOCK, M. F.; SHARP, K. L.; WILSON, A. E. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. **Water research**, v. 49, p. 207-214, 2014.

CHELLAPPA, N. T.; CHELLAPPA, S. L.; CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. **Brazilian archives of Biology and technology**, v. 51, n. 4, p. 633-641, 2008.

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

- COSTA, I. A. S. et al. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1B, p. 211-219, 2006.
- FERRÃO-FILHO, A. S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, 2009.
- FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion?. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 256-265, 2007.
- FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algal cultures and phytoplankton ecology**. Univ of Wisconsin Press, 1987.
- GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; RAVEN, J.A. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 99-131, 2005.
- GUBIANI, É. A. Variáveis físicas e químicas da água sob a abundância das assembléias fito e zooplanctônicas em um lago artificial raso. **Varia Scientia**, v. 7, n.13, p. 25-45, 2007.
- GUGGER, M. et al. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.2, p. 1097-1100, 2005.
- GUILLARD, R.R.L. Division rates. In: STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**. CUP Archive, 1979.
- HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of phycology**, v. 35, n. 2, p. 403-424, 1999.
- HOLLAND, A.; KINNEAR, S. Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide?. **Marine drugs**, v. 11, n.7, p. 2239-2258, 2013.
- HOLLAND, D. P. et al. The impacts of a high CO<sub>2</sub> environment on a bicarbonate user: the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Water research**, v. 46, n.5, p. 1430-1437, 2012.

- IBELINGS, B. W. et al. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. **Harmful Algae**, v. 40, p. 63-74, 2014.
- KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA research**, v. 14, n. 6, p. 247-256, 2007.
- KARDINAAL, W. E. A. et al. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2939-2946, 2007.
- KNOLL, A. H. Cyanobacteria and Earth History. In: FLORES, G. **The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution**. Horizon Scientific Press, 2008.
- KOKOCIŃSKI, M. et al. The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). **European Journal of Phycology**, v. 45, n.4, p. 365-374, 2010.
- KOMAREK, J. et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295-335, 2014.
- LAMPERT, W.; SOMMER, U. **Limnoecology: the ecology of lakes and streams**. Oxford university press, 2007.
- MABERLY, S. C. Diel, episodic and seasonal changes in pH and concentrations of inorganic carbon in a productive lake. **Freshwater Biology**, v. 35, n. 3, p. 579-598, 1996.
- MANTZOUKI, E. et al. Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. **Aquatic Ecology**, p. 1-18, 2015.
- MCGREGOR, G. B.; FABBRO, L. D. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 5, n. 3, p. 195-205, 2000.
- MELLO, M. M. et al. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of plankton research**, 2012.

- MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.
- MOURA, A. N. et al. Co-occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju and *Microcystis panniformis* Komárek et al. in Mundaú reservoir, a semiarid Brazilian ecosystem. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 27, n. 3, p. 322-329, 2015.
- MOREIRA, C. et al. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Archives of microbiology**, v. 197, n. 1, p. 47-52, 2015.
- PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv Für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beitrage**, v. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.
- PAERL, H. W. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. **Life**, v. 4, n. 4, p. 988-1012, 2014.
- PICCINI, C. et al. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, v. 10, n. 6, p. 644-653, 2011.
- PIERANGELINI, M. et al. Elevated CO<sub>2</sub> causes changes in the photosynthetic apparatus of a toxic cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 12, p. 1091-1098, 2014.
- PRICE, G. D. et al. Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 7, p. 1441-1461, 2008.
- PRICE, G. D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. **Photosynthesis Research**, v. 109, n. 1-3, p. 47-57, 2011.
- QIU, B.; GAO, K. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (cyanophyceae): Physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 4, p. 721-729, 2002.

- REYNOLDS, C. S. **The ecology of phytoplankton**. Cambridge University Press, 2006.
- ROCHA, O.; DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. **Journal of Plankton Research**, v. 7, n. 2, p. 279-294, 1985.
- RYAN, E. F.; HAMILTON, D. P.; BARNES, G. E. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 37, n. 4, p. 829-836, 2003.
- RZYMSKI, P. et al. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 35, p. 1-8, 2014.
- SAKER, M. L.; NOGUEIRA, I. C. G; VASCONCELOS, V. M. Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. **Limnetica**, v. 22, n. 3, p. 129-136, 2003.
- SANDRINI, G. et al. Genetic diversity of inorganic carbon uptake systems causes variation in CO<sub>2</sub> response of the cyanobacterium *Microcystis*. **The ISME journal**, v. 8, n. 3, p. 589-600, 2014.
- SANDRINI, G. et al. Changes in gene expression, cell physiology and toxicity of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* at elevated CO<sub>2</sub>. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 401, 2015.
- SANDRINI, G. et al. How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. In: **The global expansion of harmful cyanobacterial blooms: diversity, ecology, causes, and controls**. Harmful Algae (in press), 2016.
- SINHA, R. et al. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones—is climate change responsible?. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1408-1419, 2012.
- SUN, J.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of plankton research**, v. 25, n. 11, p. 1331-1346, 2003.
- TALLING, J. F. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters. **Freshwater Biology**, v. 3, n. 4, p. 335-362, 1973.

- THOMAS, M. K.; LITCHMAN, E. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. **Hydrobiologia**, v. 763, n. 1, p. 357-369, 2016.
- TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): weekly variation and relation with environmental factors in an eutrophic lake, São Paulo, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 1, p. 97-112, 2003.
- VAN DE WAAL, D. B. et al. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO<sub>2</sub>. **The ISME journal**, v. 5, n. 9, p. 1438-1450, 2011.
- VERSCHOOR, A. M. et al. Elevated CO<sub>2</sub> concentrations affect the elemental stoichiometry and species composition of an experimental phytoplankton community. **Freshwater Biology**, v. 58, n. 3, p. 597-611, 2013.
- VERSPAGEN, J. M. H et al. Contrasting effects of rising CO<sub>2</sub> on primary production and ecological stoichiometry at different nutrient levels. **Ecology letters**, v. 17, n. 8, p. 951-960, 2014.
- VIDAL, L.; KRUK, C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34 53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 2, p. 142-151, 2008.
- VISSER, P. M. et al. How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. **Harmful Algae**, v. 54, p. 145-159, 2016.
- WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological Analyses**. 3ed. Springer, New York. 2000.
- WU, Z. et al. Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. **Harmful Algae**, v. 15, p. 53-58, 2012.
- YAMAMOTO, Y. ; SHIAH, F. K.; HSU, S. C. Seasonal variation in the net growth rate of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a shallow artificial pond in northern Taiwan. **Plankton and Benthos Research**, v. 8, n. 2, p. 68-73, 2013.

**ARTIGO**

**A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO FRESHWATER BIOLOGY**



# INFLUÊNCIA DO PH E CARBONO INORGÂNICO NA COMPETIÇÃO ENTRE AS CIANOBACTÉRIAS *Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa*

MAIARA TÁBATHA DA SILVA BRITO<sup>1</sup>, PAULO JOSÉ DUARTE NETO<sup>2</sup>, RENATO JOSÉ REIS MOLICA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unidade Acadêmica de Garanhuns. Av. Bom Pastor, CEP 55292-270 Garanhuns, PE, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos, CEP 52171-030 Recife, PE, Brasil. \* Autor correspondente: renato.molica@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Estatística e Informática. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil.

## COMPETIÇÃO ENTRE *Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa*

### RESUMO

1. Florações de cianobactérias constituem um problema recorrente em ambientes límnicos por promoverem prejuízos ecológicos e restrições aos múltiplos usos dos mananciais. Sob elevada eutrofização a intensa atividade fotossintética de uma floração ocasiona acentuada diminuição das concentrações de CO<sub>2</sub> livre e aumento do pH das águas.
2. Estas condições favorecem o influxo do CO<sub>2</sub> atmosférico para a água, aumentando as concentrações de carbono inorgânico dissolvido, principalmente nas formas de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), que podem favorecer a dominância das cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*.
3. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação competitiva entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* sob diferentes condições de pH e carbono inorgânico. Foram conduzidos cultivos semi-contínuos num esquema fatorial que envolveu três diferentes condições de pH (livre, 6,8 e 8,2), realizados com e sem aeração, com e sem a adição de bicarbonato.
4. Ambas espécies apresentaram bom desempenho sob pH elevado porém, a interação entre os fatores avaliados determinou diferenças significativas nas respostas competitivas das cepas ITEP-A1 (*C. raciborskii*) e NPLJ-4 (*M. aeruginosa*) e possibilitou uma inversão de dominância de acordo com diferentes cenários. Enquanto *C. raciborskii* foi favorecida pela aeração, o aumento na concentração de bicarbonato possibilitou maior crescimento de *M. aeruginosa*.

5. Estes resultados sugerem que a afinidade e eficiência no uso do bicarbonato podem ser determinantes para a dominância e o sucesso competitivo de cianobactérias potencialmente tóxicas, como as do gênero *Microcystis*.

**Palavras-chave:** Ecologia de cianobactérias, Florações tóxicas, Mudanças climáticas, CO<sub>2</sub>.

## Introdução

Ao longo dos últimos anos, inúmeros ecossistemas límnicos vêm perdendo a qualidade das suas águas e, conseqüentemente, sua capacidade de proporcionar múltiplos usos, em função da frequente ocorrência de florações de cianobactérias (Carey *et al.*, 2012; Boopathi & Ki 2014; Ibelings *et al.*, 2014). Além de acarretar cor e odor desagradáveis à água, muitas cianobactérias são capazes de produzir potentes toxinas (saxitoxinas, anatoxinas, cilindrospermopsina e microcistinas) que podem afetar a saúde de humanos e interferir na dinâmica da biota aquática dos mananciais (Chorus & Bartram 1999; Carmichael *et al.*, 2001; Paerl, 2014; Antunes, Leão & Vasconcelos, 2015).

O aumento das concentrações de nutrientes em corpos d'água associado a alterações decorrentes das mudanças climáticas, como temperaturas elevadas e mudanças nos regimes de precipitação, podem proporcionar condições favoráveis à dominância das cianobactérias (Verschoor *et al.*, 2012; Thomas & Litchman, 2015). Além disso, o aumento na concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico vêm sendo investigado como um importante fator capaz de alterar a dinâmica do carbono inorgânico dissolvido (CID) nos ecossistemas límnicos (Sandrini *et al.*, 2016b). Nestes ambientes, a dissociação do carbono inorgânico está intimamente relacionada à mudanças no pH das águas e, portanto, o balanço entre o CO<sub>2</sub> dissolvido e o CO<sub>2</sub> atmosférico pode variar de acordo com o metabolismo aquático (autotrófico e heterotrófico) (Wetzel, 2001; Fontes *et al.*, 2015).

Em sua maioria, os mananciais de água doce são caracterizados como supersaturados em CO<sub>2</sub>, principalmente devido à mineralização do carbono orgânico alóctone (metabolismo heterotrófico). Sob condições propícias, entretanto, a intensa atividade fotossintética promove o aumento do consumo de CO<sub>2</sub> dissolvido (metabolismo autotrófico) o que pode tornar estes ambientes subsaturados em pouco tempo (Almeida *et al.*, 2016; Visser, *et al.*, 2016). Concomitante ao consumo do CO<sub>2</sub>, há também o aumento da absorção de nutrientes pelo fitoplâncton o que contribui significativamente para o aumento do pH das águas (Maberly, 1996; Qiu & Gao, 2002; Giordano, Beardall & Raven, 2005; Verschoor *et al.*, 2012; Visser *et al.*, 2016). Assim, o carbono disponível na forma de CO<sub>2</sub> livre, ora abundante em águas com

pH < 6,5, passa a diminuir, enquanto as concentrações de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) passam a aumentar, principalmente quando o pH das águas está entre ~6,5 e ~10. A partir deste pH, o carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) passa a ser a forma predominante de carbono disponível (Wetzel, 2001). Desta forma, sob baixas concentrações de  $\text{CO}_2$  livre e pH alcalino ocorre o influxo do  $\text{CO}_2$  atmosférico para a água que, ao se difundir, rapidamente se dissocia formando bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e/ou carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Qiu & Gao, 2002; Holland *et al.*, 2012).

Estas mudanças na dinâmica do carbono inorgânico dissolvido são responsáveis por favorecer alterações na comunidade fitoplanctônica, promovendo maior crescimento das cianobactérias em detrimento de outros grupos de algas (Maberly, 1996, Crossetti & Bicudo, 2005; Low-Décarie, Bell & Fussmann, 2011). Neste contexto, as espécies *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing vem ganhando destaque devido as suas capacidades de responder a mudanças na disponibilidade de carbono (Qiu & Gao, 2002; Badger & Price, 2003; Verschoor *et al.*, 2012; Sandrini *et al.*, 2014; Pierangelini *et al.*, 2014; Sandrini *et al.*, 2016c). Estas respostas estão relacionadas à expressão de genes que codificam diferentes sistemas do Mecanismo de Concentração de Carbono (ex. *BicA*, *SbtA*, BCT1) responsável por elevar as concentrações de  $\text{CO}_2$  nos carboxissomos das cianobactérias através da captação ativa do bicarbonato (Badger & Price, 2003; Price *et al.*, 2008).

A espécie *C. raciborskii* está entre as cianobactérias potencialmente tóxicas que apresenta ampla distribuição geográfica, sendo considerada invasora e capaz de colonizar diferentes ambientes (Figueredo, Giani & Bird, 2007; Antunes *et al.*, 2015). Florações desta espécie já foram registradas nas mais diversas regiões, desde as Américas à Austrália (Bouvy *et al.*, 1999; McGregor & Fabbro, 2000; Saker, Nogueira, Vasconcelos, 2003; Vidal & Kruk, 2008; Kokociński *et al.*, 2010; Yamamoto, Shiah, Hsu, 2013) e, dentre os principais fatores relacionados a tal expansão estão sua capacidade de suportar variadas temperaturas (20-35 °C), fixar nitrogênio atmosférico e posicionar-se numa profundidade adequada na coluna d'água (Chorus & Bartram, 1999; Briand *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2012; Wu, Zeng, Song, 2012). De modo geral, para *C. raciborskii* são poucos os estudos relacionados a medidas diretas do seu estoque de carbono (Burford *et al.*, 2016). Contudo, alguns autores determinaram consideráveis variações nas suas taxas de saturação de  $\text{CO}_2$  ( $K_{0,5} \text{CO}_2$ ), resultados que refletem grande atividade do seu MCC (Pierangelini *et al.* 2014, Pierangelini *et al.* 2015), enquanto outros já observaram uma relação positiva entre a taxa de crescimento de uma cepa australiana de *C. raciborskii* com o pH e a disponibilidade de bicarbonato (Holland *et al.*, 2012).

*M. aeruginosa* está entre as principais espécies formadoras de floração nos ecossistemas límnicos do mundo, sendo favorecida principalmente por altas concentrações de nutrientes, como o nitrogênio (Harke *et al.*, 2016) e é uma das cianobactérias mais amplamente estudadas quanto à atividade do seu MCC. Sandrini *et al.* (2014) e Sandrini *et al.*, (2015) detectaram a presença de diferentes sistemas de captação de carbono em diferentes cepas de *M. aeruginosa* e observaram que as cepas podem diferir quanto a expressão desses sistemas e, assim, podem responder de maneiras distintas à mudanças na disponibilidade do recurso.

Apesar de inúmeros estudos já terem investigado *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* quanto às suas respostas competitivas com relação aos seus requerimentos por nutrientes, temperatura e luz (Tucci & Sant'Anna 2003; Briand *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2007; Chellappa & Costa, 2003; Dantas, Moura & Bittencourt-Oliveira, 2011; Marinho, Souza & Lürling, 2013; Rzymiski *et al.*, 2014; Chislock, Sharp & Wilson, 2014; Thomas & Litchman, 2015), a resposta competitiva destas espécies diante de diferentes condições de pH e disponibilidade de carbono inorgânico ainda não foi estudada. Neste contexto, considerando os prejuízos ambientais e econômicos causados pelas florações de cianobactérias nocivas, o atual cenário de eutrofização dos corpos d'água e o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico (Qiu & Gao 2002; Holland *et al.*, 2012), o objetivo deste trabalho foi investigar a relação competitiva entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* quando cultivadas sob diferentes condições de pH e disponibilidade de carbono inorgânico. Espera-se entender de que maneira as mudanças no pH e na dinâmica do carbono nos corpos hídricos podem estar influenciando na relação competitiva entre estas espécies. Para tal, investigou-se as seguintes hipóteses: (i) diante de pH alcalino e fonte de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) *C. raciborskii* é melhor competidora que *M. aeruginosa*.

## **Métodos**

### *Condições de cultivo*

Para este estudo foram utilizadas as cepas NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* e a cepa ITEP-A1 de *Cylindrospermopsis raciborskii* ambas mantidas em banco de cultura, sob condições controladas, no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns. Todos os cultivos foram conduzidos em erlenmeyers de 2000 ml, contendo 1500 ml de meio ASM-1 estéril (Gorham *et al.*, 1964) e

mantidos sob temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente  $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e em fotoper\u00edodo de 12h.

### *Desenho experimental e acompanhamento dos cultivos*

O desenho experimental envolveu cultivos controle (monoespec\u00edficos) e mistos (em competi\u00e7\u00e3o) realizados em tr\u00eas diferentes condi\u00e7\u00f5es de pH (livre n\u00e3o tamponado, 6,8 e 8,2), com e sem aera\u00e7\u00e3o (ar ambiente), com e sem adi\u00e7\u00e3o de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3^-$  0,2 mM), o que resultou em um total de 36 condi\u00e7\u00f5es diferentes, realizadas em triplicata. Para os tratamentos com pH tamponado foi utilizado tamp\u00e3o HEPES Sigma-Aldrich® com concentra\u00e7\u00e3o de 40,14 mM. Os cultivos tiveram o pH ajustado para 6,8 e 8,2 com adi\u00e7\u00e3o de HCl 1M ou NaOH 1M.

Todos os cultivos foram iniciados a partir do mesmo biovolume, aproximadamente  $65.000 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ , determinados a partir de experimentos pr\u00e9vios. Este valor foi obtido por meio do produto entre a densidade, calculada por meio de contagem em c\u00e2mara de Fuchs-Rosenthal (definidas como  $\text{c\u00e9lulas.mL}^{-1}$  para NPLJ-4 e  $\text{tricomat.mL}^{-1}$  para ITEP-A1) e as dimens\u00f5es m\u00e9dias de cada esp\u00e9cie (30 indiv\u00edduos medidos em microsc\u00f3pio Zeiss Axio Scope A1) (Guillard, 1973; Hillenbrand *et al.*, 1999; Sun & Liu 2003). As amostras foram retiradas a cada dois dias e preservadas em lugol ac\u00e9tico para posterior quantifica\u00e7\u00e3o e mensura\u00e7\u00e3o, a fim de realizar-se o acompanhamento do crescimento dos cultivos.

Pr\u00f3ximo ao final da fase de crescimento exponencial (tempo 1), os cultivos serviram de in\u00f3culos para que fossem iniciados novos cultivos (tempo 2), nas mesmas condi\u00e7\u00f5es de cada tratamento (cultivo semi-cont\u00ednuo). Tal procedimento teve a finalidade de estender a fase exponencial de crescimento e assim observar melhor as respostas competitivas das esp\u00e9cies sob cada tratamento. Para este procedimento, foi utilizado o mesmo biovolume inicial do primeiro in\u00f3culo ( $65.000 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ) sendo que, para os cultivos mistos, considerou-se a esp\u00e9cie com o menor crescimento.

As taxas de crescimento ( $\mu.\text{dia}^{-1}$ ) para a fase exponencial, nos dois tempos de cultivo, foram calculadas a partir da f\u00f3rmula:  $(\text{Ln } N_2 - \text{Ln } N_1)/(\text{t}_2 - \text{t}_1)$ , em que  $N_2$  e  $N_1$  correspondem ao biovolume final e inicial ( $\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ), respectivamente e  $\text{t}_2$  e  $\text{t}_1$  correspondem ao tempo final e inicial (dias), respectivamente (Fogg & Thake, 1987). O rendimento em biovolume ( $\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ) tamb\u00e9m foi calculado para cada um dos tempos avaliados e correspondeu a  $R =$

$N_2/N_1$ , em que  $N_2$  e  $N_1$  correspondem ao biovolume final e inicial ( $\mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$ ), respectivamente.

### *Parâmetros abióticos*

Para os tratamentos com pH livre (não tamponado), o pH foi determinado utilizando-se pHmetro Marconi modelo PA 200. A alcalinidade ( $\text{mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) foi determinada a partir da adição de diferentes volumes de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,1N para reduzir o pH do meio para 3,7 – 4,0 (Talling, 1973). Ambos, pH e alcalinidade, foram considerados parâmetros para a estimativa da concentração de carbono inorgânico ( $\text{mg.Ci.L}^{-1}$ ), segundo Wetzel & Likens (2000) sendo: carbono inorgânico = alcalinidade X pH tabelado. Todos os parâmetros foram avaliados a cada dois dias.

### *Análise estatística*

Diferenças significativas no crescimento e rendimento dos cultivos controle e misto foram analisadas usando ANOVA fatorial com medidas repetidas (tempos 1 e 2). Dados de rendimento foram transformados em  $\text{Log } x+1$  por não satisfazerem os pressupostos da análise. Dados de pH, alcalinidade e carbono inorgânico dos cultivos de pH livre também foram analisadas usando ANOVA fatorial com medidas repetidas (tempos 1 e 2). Para determinação de médias significativamente diferentes, foi utilizado o teste de Tukey *a posteriori*, considerando significativas aquelas com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico Statistica 7.0 (Statsoft, 2007).

## **Resultados**

### *Crescimento e rendimento*

A fase de crescimento exponencial de ambas as espécies no tempo 1 dos cultivos controle apresentou duração média de oito dias, não sendo observado um período característico de adaptação (*lag*). Após a realização do procedimento de reinóculo, a fase de crescimento exponencial das espécies foi prolongada, estendendo-se no tempo 2 por aproximadamente mais oito dias (Fig. 1).

Foram observadas diferenças significativas nas taxas de crescimento ( $\mu\text{.dia}^{-1}$ ) e rendimento em biovolume ( $\mu\text{m}^3\text{.mL}^{-1}$ ) entre os tempos 1 e 2 dos cultivos sendo, de modo geral, as maiores taxas de crescimento dos cultivos controle e misto observadas no tempo 1 ( $F_{1,96} = 109,06$ ;  $p < 0,001$ ), enquanto que os maiores rendimentos foram alcançados no tempo 2, tanto para os cultivos controle ( $F_{1,48} = 553,02$ ;  $p < 0,001$ ) quanto para aqueles em competição ( $F_{1,48} = 359,36$ ;  $p < 0,001$ ).

As duas espécies apresentaram taxas de crescimento semelhantes nos cultivos controle com taxa média (mínima e máxima) de  $0,73 (0,45 - 0,92) \pm 0,10 \text{ dia}^{-1}$  para *M. aeruginosa* e  $0,71 (0,41 - 1,11) \pm 0,12 \text{ dia}^{-1}$  para *C. raciborskii*. Em competição, ambas apresentaram significativa redução das suas taxas de crescimento e passaram a apresentar taxa média (mínima e máxima) de  $0,64 (0,35 - 0,90) \pm 0,12 \text{ dia}^{-1}$  e  $0,67 (0,26 - 0,93) \pm 0,17 \text{ dia}^{-1}$  para *M. aeruginosa* e *C. raciborskii*, respectivamente ( $F_{3,96} = 14,96$ ;  $p < 0,001$ ).

Quando cultivadas isoladamente, para ambos os tempos de cultivo, foi possível observar forte interação entre os fatores avaliados. *M. aeruginosa* apresentou suas maiores taxas de crescimento nos cultivos realizados sem a adição de bicarbonato e com aeração em pH 8,2 e livre, enquanto que nos cultivos com pH 6,8, esta espécie alcançou suas menores taxas de crescimento (Fig. 2A). Nos cultivos sem a adição de bicarbonato, porém sem a aeração, esta espécie também apresentou altas taxas de crescimento em pH 8,2 ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,001$ ). Resultado semelhante foi observado para o seu rendimento, que foi significativamente maior naqueles cultivos realizados em pH 8,2 e livre, enquanto os seus menores rendimentos foram sempre observados em cultivos de pH 6,8, principalmente na ausência de aeração ( $F_{2,48} = 9,36$ ;  $p < 0,001$ ). Por outro lado, *Cylindrospermopsis raciborskii* não apresentou diferenças significativas no seu crescimento entre as diferentes condições de pH dos cultivos realizados sem bicarbonato, independentemente da presença ou ausência de aeração. Entretanto, sob a interação do pH 6,8, aeração e adição de bicarbonato esta espécie alcançou as suas maiores taxas de crescimento ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 2 B). Seus maiores rendimentos foram registrados em pH 8,2 e livre na presença da aeração e sem adição de bicarbonato ( $F_{2,48} = 9,36$ ;  $p < 0,001$ ).

Nos cultivos em competição, a interação entre todos os fatores analisados - pH, aeração e bicarbonato -, determinou diferenças significativas nas respostas competitivas das espécies, possibilitando a dominância de cada uma das espécies de acordo com diferentes cenários. Muitas destas respostas foram constatadas apenas no tempo 2, após a realização do reinóculo.

Cultivos mistos realizados sem adição de bicarbonato e com aeração favoreceram o crescimento de *C. raciborskii*, que em pH livre apresentou maiores taxas de crescimento do

que *M. aeruginosa* ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 2A). *M. aeruginosa* em pH livre contribuiu com apenas 9% do biovolume total do cultivo no final do tempo 1 e 6% no tempo 2 (14<sup>o</sup> dia de cultivo) (Fig. 3C). No tempo 2 dos cultivos de pH livre, a taxa de crescimento de *C. raciborskii* diminuiu (passou de 0,84 dia<sup>-1</sup> no tempo 1 para 0,73 dia<sup>-1</sup> no tempo 2) e a de *M. aeruginosa* aumentou (passou de 0,48 dia<sup>-1</sup> no tempo 1 para 0,58 dia<sup>-1</sup> no tempo 2), o que favoreceu o aumento do biovolume desta espécie, não sendo constatadas diferenças significativas entre os rendimentos das duas espécies no tempo 2 ( $F_{2,48} = 5,37$ ;  $p = 0,007$ ).

Nos cultivos mistos sem adição de bicarbonato e sem aeração não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de crescimento das espécies ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,0001$ ), mas os seus rendimentos difeririam no tempo 2 do cultivo em pH 6,8, quando *M. aeruginosa* elevou seu percentual de contribuição para mais de 80% do biovolume total ( $F_{2,48} = 5,37$ ;  $p = 0,007$ ) (Fig. 4).

Em competição com adição de bicarbonato e sem aeração, *M. aeruginosa* passou a dominar apresentando maiores taxas de crescimento ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,0001$ ) e rendimento ( $F_{2,48} = 5,37$ ;  $p = 0,007$ ) quando cultivada em pH 8,2, ocasião em que *C. raciborskii* representou apenas 5,35% do biovolume total no final do tempo 2 (Fig. 2B e Fig. 5). Nestas mesmas condições (com bicarbonato e sem aeração), apesar de não ter havido diferenças nas taxas de crescimento entre as espécies nos cultivos de pH livre e pH 6,8, o rendimento de *M. aeruginosa* foi significativamente superior a *C. raciborskii* nos dois tempos de cultivo (Fig. 5B e 5C, Tabela 1). A adição de bicarbonato ainda proporcionou na presença da aeração em pH livre maiores taxas de crescimento para *M. aeruginosa* ( $F_{6,96} = 7,86$ ;  $p < 0,001$ ), assim como maior rendimento em pH 8,2 ( $F_{2,48} = 5,37$ ;  $p = 0,007$ ) (Fig. 6C).

De modo geral, a dominância das espécies nos cultivos em competição variou e foi influenciada pela interação de todos os fatores estudados. Em pH livre na presença de aeração e sem adição de bicarbonato, *C. raciborskii* foi melhor competidora que *M. aeruginosa* (com maiores taxas de crescimento em pH livre). Já *M. aeruginosa* foi melhor competidora nos cultivos com adição de bicarbonato na ausência de aeração (com maiores rendimentos em pH 8,2, 6,8 e livre) e na presença da aeração em pH livre (com maiores taxas de crescimento) (Tabela 3).

#### *pH, alcalinidade e carbono inorgânico*

Durante os cultivos realizados com pH livre (não tamponado), o pH aumentou significativamente entre o início e o fim de cada tempo de cultivo, com maiores valores sendo registrados no final do tempo 2 ( $F_{1,24} = 78,56$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).



Sem a adição de bicarbonato, registrou-se maior pH nos cultivos aerados de *C. raciborskii* ( $7,42 \pm 0,12$ ) e nos cultivos não aerados de *M. aeruginosa* ( $7,97 \pm 0,13$ ) ( $F_{2,24} = 42,35$ ;  $p < 0,001$ ). Nos cultivos controle a alcalinidade e o carbono inorgânico não foram influenciados pela aeração porém, nos cultivos mistos com aeração foram observados os seus maiores valores ( $F_{2,12} = 17,49$ ;  $p = 0,0002$ ;  $F_{2,12} = 32,9$ ;  $p = 0,0001$ , respectivamente), (Tabela 2).

Com a adição de bicarbonato houve um aumento significativo no pH de todos os cultivos, controles e mistos ( $F_{2,24} = 43,28$ ;  $p < 0,0001$ ), com valores mais alcalinos sendo registrados nos controles de *M. aeruginosa* ( $8,77 \pm 0,2$ ) e misto ( $9,13 \pm 0,32$ ), ambos na ausência de aeração (Tabela 2). Sob a influência da aeração, foram registrados maiores valores de carbono inorgânico nos cultivos controle de *M. aeruginosa* ( $F_{2,12} = 16,31$ ;  $p = 0,0003$ , respectivamente) enquanto que na ausência de aeração foram observados os maiores valores de alcalinidade nos cultivos de *M. aeruginosa* ( $F_{2,12} = 47,61$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

## Discussão

No presente estudo investigou-se a relação competitiva entre *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* diante de alterações no pH e na disponibilidade de carbono inorgânico. Foi possível observar que a interação entre todos os fatores analisados determinou diferenças significativas nas respostas competitivas das espécies uma vez que, as diferentes condições de pH utilizadas (pH Livre, 6,8 e 8,2) proporcionaram variações nas formas e concentrações de carbono disponíveis (CO<sub>2</sub> livre, bicarbonato e carbonato). De acordo com a química de dissociação do carbono na água doce, apesar de haver maior concentração de bicarbonato em pH 6,8 (~60%), o CO<sub>2</sub> livre ainda representa grande parcela do carbono disponível nesse pH (~40%). Por outro lado, em pH 8,2 o bicarbonato corresponde quase a 100% do carbono disponível (Smith & Walker 1980; Wetzel, 2001; Holland *et al.*, 2012).

Estudos pioneiros realizados por Moss (1973), Shapiro (1984) e Klemer (1991) avaliaram a forte influência do pH e do carbono inorgânico no crescimento das cianobactérias e destacaram que o pH elevado pode favorecer o crescimento de algumas espécies em razão, justamente, do aumento na disponibilidade do bicarbonato. Hein (1997), Caraco & Miller (1998) e Visser *et al.*, (2016) corroboraram aqueles resultados e continuaram sustentando a ideia de que o pH e as diferentes formas de carbono são fatores capazes de guiar mudanças expressivas no crescimento das espécies fitoplanctônicas influenciando, por exemplo, nas capacidades de armazenamento de polissacarídeos e na regulação da flutuação. Neste estudo,

o melhor desempenho de cada uma das espécies, nos cultivos controle, ocorreu justamente naquelas interações que envolviam o pH 8,2.

De modo geral, o sistema semi-contínuo utilizado possibilitou uma melhor análise das respostas competitivas diante das diferentes condições avaliadas uma vez que, em cultivos fechados (batch) a fase de crescimento exponencial das espécies, nas condições estudadas, é curta (em torno de 8 dias). Desta forma, apesar das maiores taxas de crescimento terem sido registradas no tempo 1, sob algumas circunstâncias, diferenças no rendimento e taxa de crescimento das espécies, assim como nos parâmetros abióticos (pH), foram observadas somente ao longo do tempo 2.

Considerando as respostas dos cultivos controle observou-se que a cepa NPLJ-4 de *M. aeruginosa* apresentou melhor crescimento e rendimento nos tratamentos com maior pH, condições estas que proporcionaram maior disponibilidade de carbono na forma de bicarbonato que de CO<sub>2</sub> livre. Quando esta cepa foi cultivada sob aeração em pH 6,8, seu crescimento foi reduzido mas, a adição do bicarbonato nesta interação promoveu um acréscimo na sua taxa de crescimento, o que demonstra que esta fonte extra de recurso foi capaz de suprir suas necessidades de carbono, possibilitando seu melhor desempenho (Fig. 2A e 2B; Tabela 1).

Por outro lado, a cepa ITEP-A1 de *C. raciborskii*, nos cultivos controle não diferiu seu crescimento diante das diferentes condições de pH dos cultivos sem bicarbonato, porém foi influenciada fortemente pela aeração. A influência da aeração no crescimento desta espécie pôde ser observada na interação entre o pH 6,8 e adição de bicarbonato. O acréscimo da aeração nessa interação pode ter promovido um aumento na disponibilidade de CO<sub>2</sub> livre para esta espécie proporcionando taxas de crescimento superiores àquelas encontradas em pH 6,8, com bicarbonato e sem aeração (Fig. 2B).

Outros efeitos oriundos da aeração, como por exemplo a diminuição do sombreamento, não podem ser descartados, uma vez que Holland *et al.*, (2012) destacam que alta disponibilidade de luz é decisiva para o bom funcionamento do MCC de *C. raciborskii*. Por outro lado, o bom desempenho de *C. raciborskii* em condições de maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> livre já foi relatado por alguns estudos (Tonetta, Petrucio & Laudares-Silva, 2013; Pierangelini *et al.* 2014) enquanto outros destacam que esta espécie pode apresentar diferentes taxas de saturação para o CO<sub>2</sub> (K<sub>0,5</sub>) e, assim, pode responder de maneiras distintas à disponibilidade do carbono inorgânico (Wu, Zou & Gao, 2008; Holland *et al.*, 2012). Neste contexto, Pierangelini *et al.* (2014) ressaltaram que devido a sua grande plasticidade, a resposta de *C. raciborskii* ao carbono inorgânico pode ser comparada as das demais cianobactérias, mas ainda são poucos os trabalhos que tenham determinado os fatores

reguladores do seu mecanismo de concentração de carbono, sobretudo, considerando as respostas de diferentes ecótipos (Pierangelini *et al.*, 2015; Burford *et al.*, 2016).

De modo geral, foi possível observar que *M. aeruginosa* dominou sob condições de alta alcalinidade e alto pH, mas foi superada por *C. raciborskii* sob baixa alcalinidade e baixo pH. De maneira semelhante, outros estudos também observaram acentuada variação na resposta competitiva entre cianobactérias ou entre estas e algas eucarióticas diante de mudanças no pH e disponibilidade de carbono inorgânico. Low-Décarie, Bell & Fussmann (2011), por exemplo, ao estudarem a relação competitiva entre espécies de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Synechococcus* observaram que, apesar destas serem competitivamente superiores em baixos níveis de CO<sub>2</sub> (~560 ppm) e sob pH neutro (condição semelhante àquela em que *C. raciborskii* foi melhor competidora neste estudo), sua capacidade competitiva pode ser reduzida à medida em que os níveis de CO<sub>2</sub> se elevavam (~1000 ppm). Os autores ainda destacaram que nestas condições, as clorófitas seriam competidoras mais eficientes.

Crossetti & Bicudo (2005), Shi *et al.* (2015) e Sandrini *et al.*, (2016) também observaram para *M. aeruginosa* menor crescimento e uma possível redução da sua capacidade competitiva quando esta espécie é submetida a uma maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> livre. No presente estudo, aquelas interações que envolviam o pH 6,8 (~40% de CO<sub>2</sub> livre) promoveram menor desempenho desta espécie. A adição do bicarbonato, por sua vez, promoveu um alívio na limitação de carbono para *M. aeruginosa*, o que revela que esta fonte de carbono pode ter sido capaz de suprir a demanda necessária para promover aumento no crescimento e rendimento desta espécie.

De modo geral, os resultados aqui observados corroboram outros estudos acima mencionados os quais ressaltam que algumas cianobactérias podem ser consideradas boas competidoras sob maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> livre, enquanto outras são dominantes em pH mais alcalino e sob maior disponibilidade de bicarbonato. Estas respostas, por sua vez, apresentam uma relação espécie-específica e tendem a variar de acordo com a expressão dos diferentes sistemas que compõem o Mecanismo de Concentração de Carbono (MCC) das cianobactérias, mecanismo este que pode, além de variar a sua expressão entre as diferentes espécies, variar entre diferentes cepas da mesma espécie (Sandrini *et al.*, 2014; Visser *et al.*, 2016).

Hoje sabe-se que o modo como as cianobactérias respondem às flutuações nas formas disponíveis de carbono é resultado de uma grande variabilidade genotípica, que determinam diferentes eficiências na captação do CO<sub>2</sub> e/ou bicarbonato alterando, assim, suas respostas competitivas (Holland *et al.*, 2012; Sandrini *et al.*, 2014; Sandrini *et al.*, 2015). Para cianobactérias são conhecidos cinco sistemas envolvidos na atividade do MCC, sendo dois

sistemas de captação de CO<sub>2</sub> e três transportadores de bicarbonato que apresentam diferentes características cinéticas como destacado por Price *et al.* (2008), Price (2011), Sandrini *et al.* (2014) e Burnap *et al.*, (2015).

Os dois sistemas de captação de CO<sub>2</sub> conhecidos são o NDH-I<sub>3</sub> de alta afinidade pelo CO<sub>2</sub> (K<sub>0,5</sub> = 1- 2 μM) e o NDH-I<sub>4</sub> de baixa afinidade (K<sub>0,5</sub> = 10- 15 μM). O sistema BCT1 é responsável pela captação de bicarbonato e conhecido por possuir alta afinidade pelo seu substrato (K<sub>0,5</sub> = 15μM) e média taxa de fluxo, expressando-se apenas sob condições de limitação de carbono inorgânico. Os outros dois sistemas responsáveis pelo transporte do bicarbonato são o *SbtA* e *BicA*, ambos sódio dependentes. O primeiro sistema é um transportador de alta afinidade por bicarbonato (K<sub>0,5</sub> = 5 μM) que possui baixa taxa de fluxo, enquanto que o *BicA* apresenta baixa afinidade pelo substrato (K<sub>0,5</sub> = 90-170 μM), porém alta taxa de fluxo.

No presente estudo, as variações no pH, alcalinidade e disponibilidade de carbono inorgânico podem ter estimulado a expressão de diferentes sistemas de bicarbonato que foram responsáveis pelas respostas das espécies em cada condição estudada. Para a espécie *M. aeruginosa*, por exemplo, Sandrini *et al.* (2014) já registraram grande variação na expressão dos diferentes sistemas de captação de bicarbonato, com diferentes cepas expressando ambos os sistemas de alta e baixa afinidade, ou apenas o de baixa afinidade.

Como observado por Sandrini *et al.* (2016c), enquanto elevadas concentrações de bicarbonato podem favorecer aquelas cepas que expressam apenas o sistema de captação de alto fluxo *BicA* (K<sub>0,5</sub> alto), aquelas que expressam sistemas de alta afinidade (K<sub>0,5</sub> baixo) são favorecidas em baixas concentrações de bicarbonato. De acordo com tais características, os resultados deste trabalho demonstram que a cepa ITEP-A1 de *C. raciborskii* comportou-se como uma espécie especialista de alta afinidade, apresentando bom desempenho ao competir naquelas condições que disponibilizaram menor concentração de bicarbonato (pH Livre, aerado e sem adição de bicarbonato). Por outro lado, a cepa NPLJ-4 de *M. aeruginosa* pode ser considerada uma especialista de alto fluxo, apresentando suas maiores taxas de crescimento e rendimento em condições com altas concentrações de bicarbonato (pH 8,2 e livre com adição de bicarbonato).

Alguns estudos têm demonstrado que respostas semelhantes às registradas neste trabalho, ou seja, dominância de espécies especialistas de alto fluxo, podem tornar-se comuns na natureza à medida que os níveis de CO<sub>2</sub> atmosféricos e de carbono inorgânico nos ecossistemas aquáticos se elevam (Van de Waal *et al.*, 2011; Sandrini *et al.*, 2014). Assim, cianobactérias antes limitadas por carbono (*BicA*), poderão dominar a comunidade fitoplanctônica dos ecossistemas superando aquelas espécies (e/ou cepas) especialistas de alta

afinidade (*SbtA*). Esta dinâmica, por sua vez, é dependente da presença no ambiente de diferentes ecótipos capazes de expressar os diferentes sistemas do MCC pois, diante de alguma modificação na disponibilidade de carbono, aquele ecótipo que apresente um sistema mais adequado a nova condição ambiental, irá se sobressair (Van de Waal *et al.*, 2011; Sandrini *et al.*, 2016a). Essas mudanças podem, por exemplo, favorecer a dominância de cianobactérias potencialmente tóxicas como as do gênero *Microcystis* (Verspagem *et al.*, 2014b).

Além da existência de ecótipos que expressem diferentes sistemas de captação de carbono, é preciso considerar que o pH e a alcalinidade são fatores que atuam regulando a dinâmica do carbono e, assim, determinam a forma como este recurso estará disponível no ambiente, seja como CO<sub>2</sub> livre, bicarbonato ou carbonato. Durante os cultivos de pH livre (não tamponado) neste trabalho, a aeração e a adição de bicarbonato foram responsáveis por elevar o pH, a alcalinidade e a concentração de carbono inorgânico dos cultivos, demonstrando que, mesmo utilizando-se ar ambiente e baixa molaridade de NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,2 mM), ambos promoveram maior disponibilidade de carbono para os cultivos, levando à diferentes respostas competitivas (Tabela 2). Ainda considerando a influência da alcalinidade das águas, Verspagem *et al.* (2014a) ressaltaram que aqueles ecossistemas de menor alcalinidade (com até 1 mEqL<sup>-1</sup>, que corresponde a 50 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) são considerados muito mais susceptíveis ao aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico, podendo este aumento diminuir a limitação de carbono e proporcionar dominância de cianobactérias.

Considerando que o consumo de CO<sub>2</sub> livre e/ou bicarbonato promovem aumento no pH do meio, as respostas competitivas das espécies aqui estudadas também podem ser observadas a partir das mudanças neste fator durante os cultivos de pH livre. Sem a adição de bicarbonato e com aeração ocorreu maior aumento de pH nos cultivos de *C. raciborskii* (média de 7,42 ± 0,12), o que nos permite inferir a presença de menores níveis de CO<sub>2</sub> livre, refletindo, portanto, um eficiente consumo do CO<sub>2</sub> livre por esta espécie. De modo contrário, nas mesmas condições citadas acima, houve menor aumento de pH nos cultivos de *M. aeruginosa* (7,07 ± 0,09), o que demonstra sua baixa eficiência no uso do CO<sub>2</sub> livre que, provavelmente, permaneceu abundante no meio, causando valores de pH mais baixos. De maneira semelhante, sob influência do bicarbonato *M. aeruginosa* foi capaz de elevar o pH do meio muito mais do que o fez *C. raciborskii*, quando cultivada isoladamente. Assim, estas modificações de pH demonstram que naquelas situações em que as espécies foram mais eficientes no consumo do recurso disponível, elevando o pH do meio, também sobressaíram-se nos cultivos mistos. De acordo com Tilman (1982), variações na disponibilidade do recurso pelo qual as espécies estão competindo podem indicar suas distintas capacidades

competitivas, sendo considerada melhor competidora aquela que apresentar menor requerimento pelo recurso, mantendo-o em níveis mais baixos.

De modo geral, os resultados aqui expostos apresentam um exemplo de como *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* são capazes de dominar sob diferentes condições de pH e disponibilidade de carbono inorgânico e como mudanças nestes parâmetros podem promover variações nas suas relações competitivas. Desta forma, a hipótese inicial não foi aceita visto que *C. raciborskii* foi boa competidora apenas nas condições de menor pH e alcalinidade enquanto que sob pH alcalino e disponibilidade de bicarbonato, *M. aeruginosa* apresentou melhor crescimento.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão de bolsa à primeira autora. E à Central de Laboratórios (CENLAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns pela estrutura física para execução desta pesquisa.

## **Referências**

- Almeida R. M., Nóbrega G. N., Junger P. C., Figueiredo A. V., Andrade A. S., Moura C. G., ... & Piñeiro-Guerra J. M. (2016) High Primary Production Contrasts with Intense Carbon Emission in a Eutrophic Tropical Reservoir. *Frontiers in microbiology*, **7**.
- Antunes J. T., Leão P. N. & Vasconcelos V. M. (2015) *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*, **6**,473.
- Badger M. R. & Price G. D. (2003) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental botany*, **54**, 609-622.
- Boopathi T. & Ki, J. S. (2014) Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins*, **6**, 1951-1978.

- Bouvy M., Molica R., Oliveira S., Marinho M. & Beker B. (1999) Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**, 285-297.
- Briand J. F., Leboulanger C., Humbert J. F., Bernard C. & Dufour P. (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, **40**, 231-238.
- Burford M. A., Beardall J., Willis A., Orr P. T., Magalhaes V. F., Rangel, L. M., Azevedo S. M. F. O. E. & Neilan B. A. (2016) Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, **54**, 44-53.
- Burnap R. L., Hagemann M. & Kaplan A. (2015) Regulation of CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria. *Life*, **5**, 348-371.
- Caraco N. F. & Miller, R. (1998) Effects of CO<sub>2</sub> on competition between a cyanobacterium and eukaryotic phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 54-62.
- Carey C. C., Ibelings B. W., Hoffmann E. P., Hamilton D. P. & Brookes J. D. (2012) Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, **46**, 1394-1407.
- Carmichael W. W., Azevedo S. M. O., An J. S., Molica R. J. R., Jochimsen E. M., Lau S., Rinehart K. L., Shaw G. R. & Eaglesham G. K. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives*, **109**, 663-668.
- Chellappa N. T., & Costa M. A. M. (2003) Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a Eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. *Acta Oecologica*, **24**, S3-S10.
- Chislock M. F., Sharp K. L. & Wilson A. E. (2014) *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *Water Research*, **49**: 207-214.
- Chorus E. I. & Bartram J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York, E & FN Spon, 400p.

- Crossetti L. O., Bicudo C. E. M. (2005) Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, **541**: 71–85
- Dantas Ê. W., Moura A. N. & Bittencourt-Oliveira M. D. C. (2011) Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **83**, 1327-1338.
- Figueredo C. C., Giani A. & Bird D. F. (2007) Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology*, **43**: 256 – 265.
- Fogg G. E. & Thake, B. (1987) *Algae cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press, Ltd., London. Third Ed. p.269.
- Fontes M. L. S., Marotta H., MacIntyre S., Petrucio M. M. (2015) Inter- and intra-annual variations of  $p\text{CO}_2$  and  $p\text{O}_2$  in a freshwater subtropical coastal lake. *Inland Waters*, **5**, 107-116.
- Giordano M., Beardall J. & Raven J. A. (2005).  $\text{CO}_2$  concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, **56**: 99-131.
- Gorham P. R., Mclachlav J. R., Hammer V. T. & Kim, W. K. (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **15**, 796 – 804.
- Guillard R. R. L. (1973) Division rates. In: *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. (Ed J. Stein.), pp. 289-311. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harke M. J., Steffen M. M., Gobler C. J., Otten T. G., Wilhelm S. W., Wood S. A., & Paerl H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*, **54**, 4-20.
- Hein M. (1997) Inorganic carbon limitation of photosynthesis in lake phytoplankton. *Freshwater Biology*, **37**, 545-552.



- Hillebrand H., Dürselen C. D., Kirschtel D., Pollinger U. & Zohary T. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, **35**, 403-424.
- Holland D. P., Pantorno, A., Orr P. T., Stojkovic S. & Beardall J. (2012) The impacts of a high CO<sub>2</sub> environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Water Research*, **46**, 1430 – 1437
- Ibelings B. W., Backer L. C., Kardinnal W. E. A. & Chorus I. (2014) Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae*, **40**, 63-74.
- Klemer, A. R. (1991) Effects of nutritional status on cyanobacterial buoyancy, blooms, and dominance, with special reference to inorganic carbon. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 1133-1138.
- Kokociński M., Stefaniak K., Mankiewicz-Boczek J., Izydorczyk K. & Soininen, J. (2010) The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). *European Journal of Phycology*, **45**, 365-374.
- Low-Décarie E., Bell G., Fussmann G. F. (2015) CO<sub>2</sub> alters community composition and response to nutrient enrichment of freshwater phytoplankton. *Oecologia*, **177**, 875-883,
- Maberly S. C. (1996) Diel, episodic and seasonal changes in pH and concentrations of inorganic carbon in a productive lake. *Freshwater Biology*, **35**, 579-598.
- Marinho M. M., Souza M. B. G. & Lürling, M. (2013) Light and phosphate competition between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* is strain dependent. *Microbial ecology*, **66**, 479-488.
- McGregor G. B. & Fabbro L. D. (2000) Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, **5**, 195-205.
- Moss B. (1973) The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *The Journal of Ecology*, pp.157-177.

- Paerl H. W. & Paul V. J. (2012) Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water research*, **46**, 1349-1363.
- Paerl H. W. (2014) Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. *Life*, **4**, 988-1012.
- Pierangelini M., Sinha R., Willis A., Burford M. A., Orr, P. T., Beardall J. & Neilan, B.A. (2015) Constitutive cylindrospermopsin pool size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different light and CO<sub>2</sub> partial pressure conditions. *Applied and environmental microbiology*, **81**, 3069-3076.
- Pierangelini M., Stojkovic S., Orr P. T., Beardall J. (2014) Elevated CO<sub>2</sub> causes changes in the photosynthetic apparatus of a toxic cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of plant physiology*, **171**, 1091-1098.
- Price G. D., Badger M. R., Woodger F. J. & Long B. M. (2008) Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of experimental botany*, **59**, 1441-1461.
- Price G. D. (2011) Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Photosynthesis Research*, **109**, 47-57.
- Qiu, B. & Gao, K. (2002) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (cyanophyceae): Physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon. *Journal of Phycology*, **38**, 721-729.
- Rzyski P., Poniedziałek B., Kokociński M., Jurczak T., Lipski D. & Wiktorowicz K. (2014) Interspecific allelopathy in cyanobacteria: cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, **35**, 1-8.
- Saker M. L., Nogueira I. C. G. & Vasconcelos V. M. (2003) Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) in portuguese freshwaters. *Limnetica*, **22**, 129-136.
- Sandrini G., Matthijs H. C., Verspagen J. M., Muyzer G. & Huisman J. (2014) Genetic diversity of inorganic carbon uptake systems causes variation in CO<sub>2</sub> response of the cyanobacterium *Microcystis*. *The ISME journal*, **8**, 589-600.

- Sandrini G., Cunsolo S., Schuurmans J. M., Matthijs H. C. & Huisman, J. (2015) Changes in gene expression, cell physiology and toxicity of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* at elevated CO<sub>2</sub>. *Frontiers in microbiology*, **6**, 401.
- Sandrini G., Verspagen J. M. H., Visser P. M, Stal L. J, Matthijs H. C. P., Davis T. W., Paerl H. W. & Huisman J. (2016a) How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. In: *The global expansion of harmful cyanobacterial blooms: diversity, ecology, causes, and controls*. Harmful Algae (in press).
- Sandrini G., Tann R. P, Schuurmans J. M., Van Beusekom S. A. M., Matthijs H. C.P. & Huisman J (2016b) Diel Variation in Gene Expression of the CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism during a Harmful Cyanobacterial Bloom. *Frontiers Microbiology*, **7**, 551.
- Sandrini G., Ji X. Verspagen J. M., Tann R. P., Slot P. C., Luimstra V. M., Schuurmans J. M.; Matthijs H.C.P. Huisman, J. (2016c) Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201602435.
- Shapiro J. 1984. Blue-green dominance in lakes: the role and management significance of pH and CO<sub>2</sub>. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, **69**,765-780.
- Shi, X., Zhao X., Zhang M., Yang Z., Xu P., & Kong F. (2015) The responses of phytoplankton communities to elevated CO<sub>2</sub> show seasonal variations in the highly eutrophic Lake Taihu. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **73**, 727-736.
- Sinha R., Pearson L. A., Davis T. W., Burford M. A., Orr P. T. & Neilan B. A. (2012) Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones—is climate change responsible? *Water research*, **46**, 1408-1419.
- Smith F. A. & Walker N. A. (1980) Photosynthesis by aquatic plants: effects of unstirred layers in relation to assimilation of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and to carbon isotopic discrimination. *New Phytologist*, **86**, 245-259.
- STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 7. 2007. <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>
- Sun J. & Liu D. (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, **25**, 1331-1346.

- Tilman D. (1982) *Resource competition and community structure*. Princeton university press, Princeton.
- Talling J. F. (1973) The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters. *Freshwater Biology*, **3**, 335-362.
- Thomas M. K. & Litchman E. (2016) Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. *Hydrobiologia*, **763**, 357-369.
- Tonetta D., Fontes M. L. S. & Petrucio M. M. (2015) Linking summer conditions to CO<sub>2</sub> undersaturation and CO<sub>2</sub> influx in a subtropical coastal lake. *Limnology*, **16**, 193-201.
- Tucci A. & Sant'anna C. (2003) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **26**, 97-112.
- Van de Waal D.B., Verspagen J. M., Finke J. F., Vournazou V., Immers A. K., Kardinaal W. E. A., Tonk L., Becker S., Donk E. V., Visser P. M., Huisman, J. 2011. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO<sub>2</sub>. *The ISME journal*, **5**, 1438-1450.
- Verschoor A. M., Van Dijk, M. A., Huisman J. E. F. & Van Donk E. (2012) Elevated CO<sub>2</sub> concentrations affect the elemental stoichiometry and species composition of an experimental phytoplankton community. *Freshwater Biology*, **58**, 597-611.
- Verspagen, J. M., Van de Waal, D. B., Finke, J. F., Visser, P. M., Van Donk, E., & Huisman, J. (2014a). Rising CO<sub>2</sub> levels will intensify phytoplankton blooms in eutrophic and hypertrophic lakes. *PloS one*, **9**, e104325.
- Verspagen, J. M., Van de Waal, D. B., Finke, J. F., Visser, P. M. Huisman, J. (2014b). Contrasting effects of rising CO<sub>2</sub> on primary production and ecological stoichiometry at different nutrient levels. *Ecology letters*, **17**, 951-960.
- Visser P. M., Verspagen J. M., Sandrini G., Stal L. J., Matthijs H. C., Davis T. W., Paerl H. W. & Huisman J. (2016) How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, **54**, 145-159.
- Wetzel R. G. & Likens G.E. (2000) *Limnological Analyses*. 3rd ed. Springer, New York.

Wetzel, R. G. (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems*. 3rd ed. Academic Press, San Diego.

Wu H., Zou D., & Gao, K. (2008) Impacts of increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis and growth of micro-and macro-algae. *Science in China Series C: Life Sciences*, **51**, 1144-1150.

Wu Z., Zeng B. & Li R., Song, L. (2012) Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. *Harmful Algae*, **15**, 53 – 58.

Yamamoto Y., Shiah F. K. & Hsu, S. C. (2013) Seasonal variation in the net growth rate of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a shallow artificial pond in northern Taiwan. *Plankton and Benthos Research*, **8**, 68-73.

**Tabela 1:** Rendimento médio (Tempos 1 e 2) em biovolume ( $\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$ ) das espécies *M. aeruginosa* (NPLJ-4) e *C. raciborskii* (ITEP-A1) nos cultivos controle e misto, para todas as condições. Desvio padrão entre parênteses.

CULTIVO	pH	SEM BICARBONATO		COM BICARBONATO	
		COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO	COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO
<b>CONTROLE</b>					
NPLJ-4	8,2	1538,1 (754,2)	633,5 (215,9)	3074,5 (1039,3)	1664,7 (493)
	6,8	345,6 (142)	154 (90,01)	1198,8 (818,9)	149,6 (45,1)
	Livre	2190,1 (2288)	617,7 (307,2)	4253,2 (1425,7)	911,5 (263,9)
ITEP-A1	8,2	5175,1 (3336)	1169,2 (334,6)	2366,1 (2454)	1475,1 (1225)
	6,8	1159,7 (654)	443,3 (227,7)	971,4 (816,4)	335,5 (176,5)
	Livre	16629,1 (19529)	350,5 (83,4)	1823,2 (2848)	566,9 (227,7)
<b>MISTO</b>					
NPLJ-4	8,2	2338,3 (2320)	254,6 (277,4)	1384,8 (1001,86)	462,1 (116)
	6,8	677,1 (679)	441,2 (398,9)	621,3 (532)	94,7 (16,17)
	Livre	1268,5 (1406)	125,1 (27,72)	3872,8 (3302,5)	225,5 (220,9)
ITEP-A1	8,2	1581,6 (1471)	170,6 (76,6)	974,7 (1003)	106,8 (38,9)
	6,8	1975,5 (2498,3)	85,2 (19)	1988,9 (2804,8)	17,1 (7,5)
	Livre	826,2 (568,2)	156,9 (70,8)	467,8 (249,2)	6,3 (4,4)

**Tabela 2:** Valores médios (Tempos 1 e 2) do pH, alcalinidade ( $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) e carbono inorgânico ( $\text{mg.Ci.L}^{-1}$ ) obtidos durante os cultivos de pH livre. Desvio padrão entre parênteses.

CULTIVO	PARÂMETROS	SEM BICARBONATO		COM BICARBONATO	
		COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO	COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO
<b>CONTROLE</b>					
NPLJ-4	pH	7,07 (0,09)	7,97 (0,13)	8,64 (0,12)	8,77 (0,23)
	Alcalinidade	7,81 (0,34)	8,23 (1,67)	46,26 (0,71)	40,51 (3,84)
	Carbono inorgânico	1,88 (0,08)	1,93 (0,38)	13,11 (0,35)	9,85 (0,83)
ITEP-A1	pH	7,42 (0,12)	7,56 (0,07)	8,01 (0,11)	8,17 (0,08)
	Alcalinidade	8,88 (0,97)	7,75 (0,27)	43,85 (0,55)	37,52 (5,32)
	Carbono inorgânico	2,16 (0,22)	1,86 (0,07)	11,55 (0,31)	9,68 (1,29)
MISTO	pH	7,68 (0,61)	7,71 (0,13)	8,58 (0,08)	9,13 (0,32)
	Alcalinidade	14,58 (7,01)	8,57 (0,69)	44,92 (1,5)	32,56 (0,73)
	Carbono inorgânico	3,50 (1,68)	1,93 (0,12)	11,70 (1,32)	8,19 (0,18)

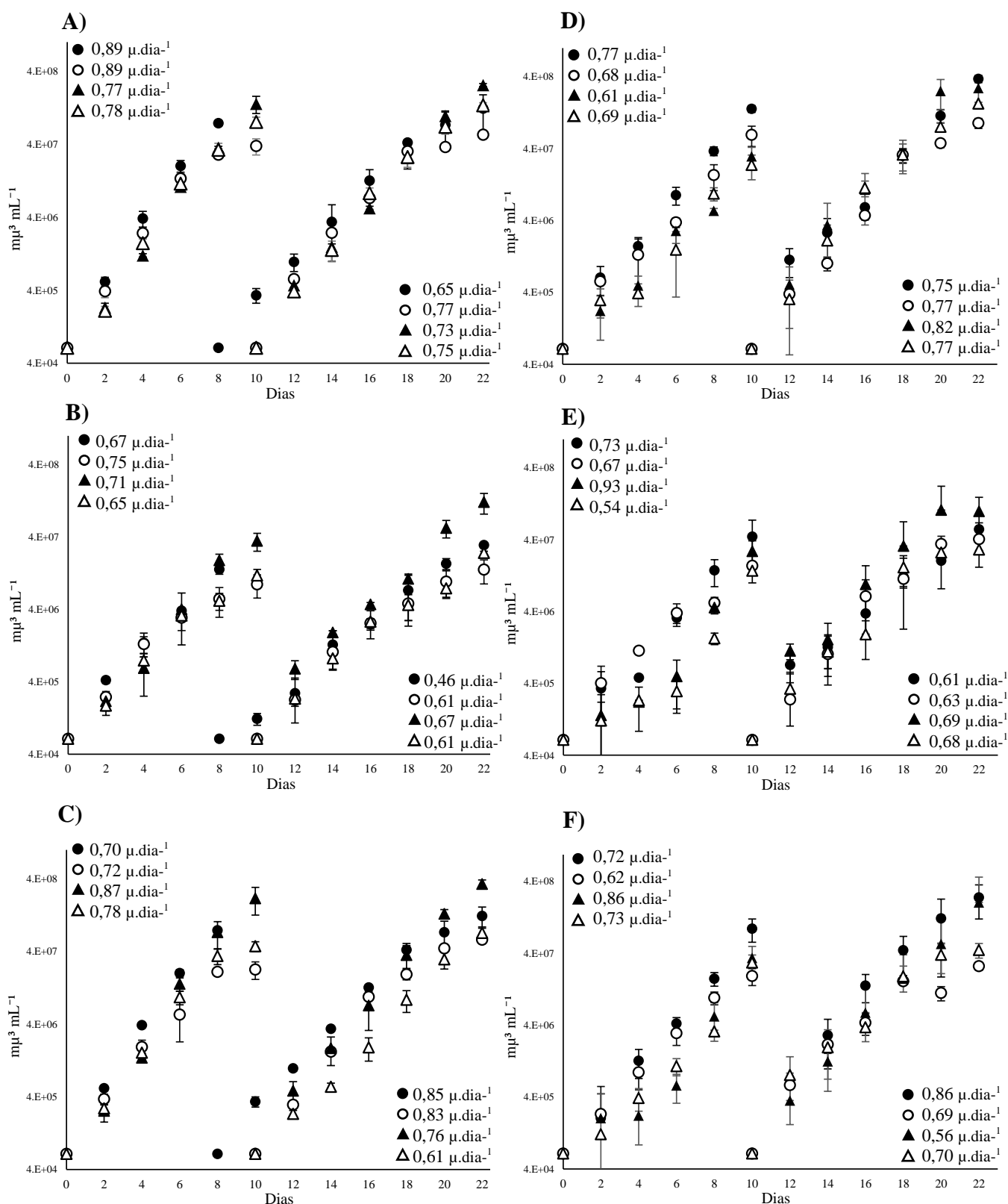
**Tabela 3:** Espécies que apresentaram melhor desempenho em cada um das condições estudadas. Cr - *Cylindrospermopsis raciborskii*; Ma - *Microcystis aeruginosa*. Símbolos entre parênteses representam a maiores taxas de crescimento ( $\mu$ ) e maiores rendimentos (*R*). -- indica ausência de diferença estatística entre o crescimento e rendimento das espécies.

pH	SEM BICARBONATO		COM BICARBONATO	
	COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO	COM AERAÇÃO	SEM AERAÇÃO
8,2	--	--	Ma ( <i>R</i> )	Ma ( <i>R</i> )
6,8	--	Ma ( <i>R</i> )	--	Ma ( <i>R</i> )
Livre	Cr ( $\mu$ )	--	Ma ( $\mu$ )	Ma ( <i>R</i> )
	Cr ( <i>R</i> )	--	Ma ( <i>R</i> )	

## **FIGURAS**

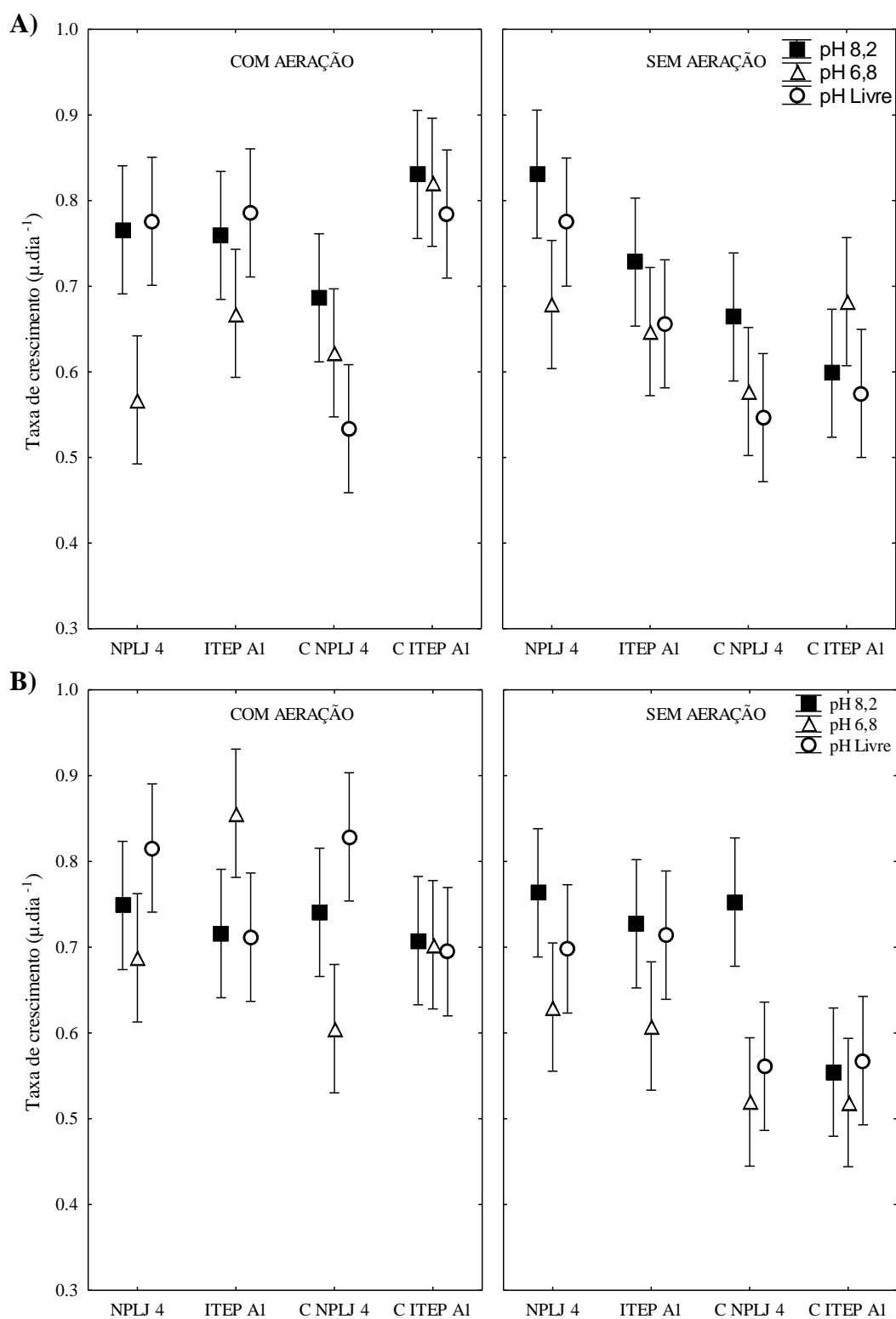




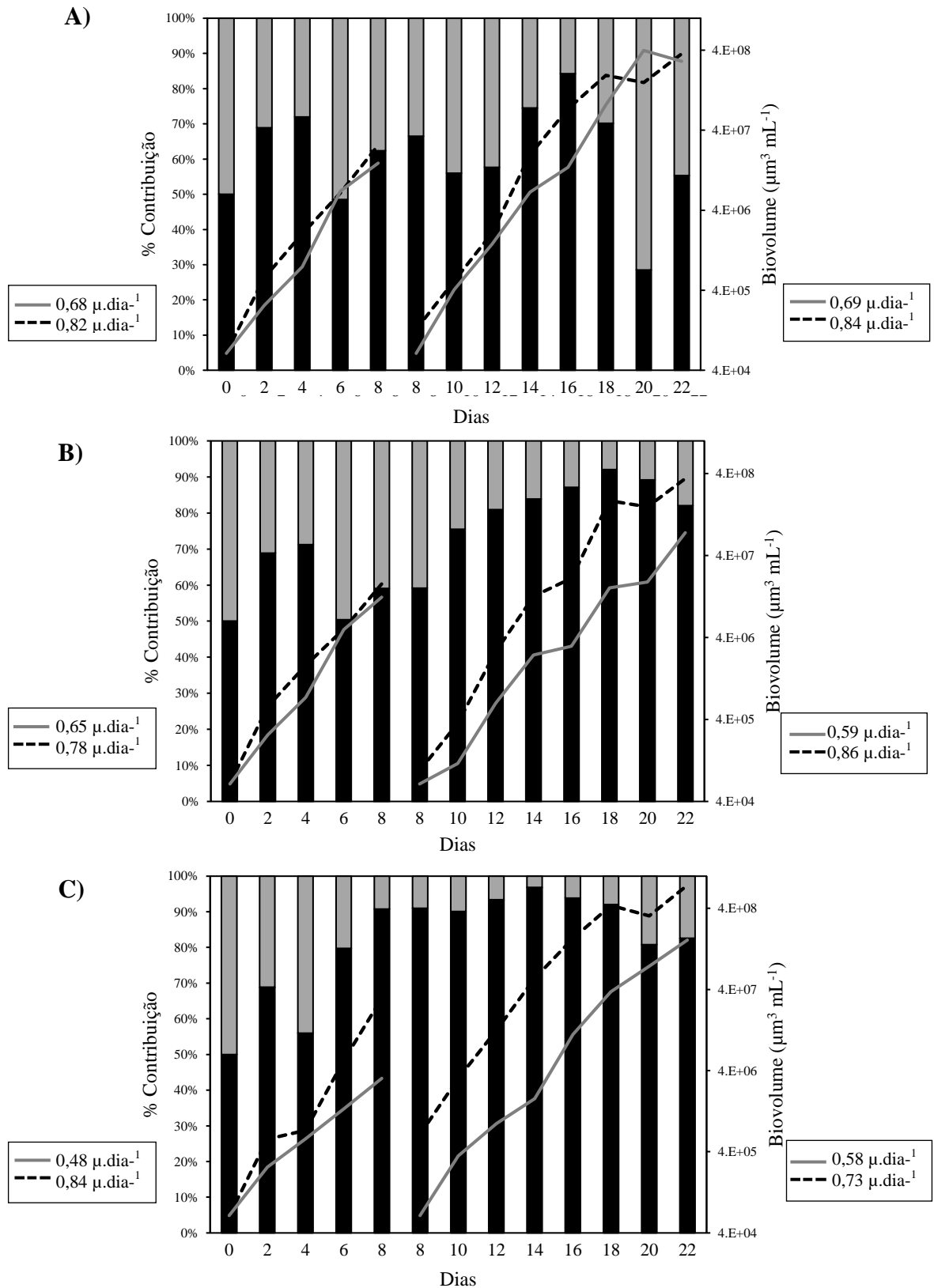


**Fig. 1:** Curvas de crescimento das espécies: *M. aeruginosa* sob pH 8,2 (A), 6,8 (B) e livre (C) e *C. raciborskii* sob pH 8,2 (D), 6,8 (E) e livre (F) ● - Com aeração e sem bicarbonato; ○ - Sem aeração e sem bicarbonato; ▲ - Com aeração e com bicarbonato; △ - Sem aeração e com bicarbonato. Barras representam o desvio padrão. Destaque para as taxas de

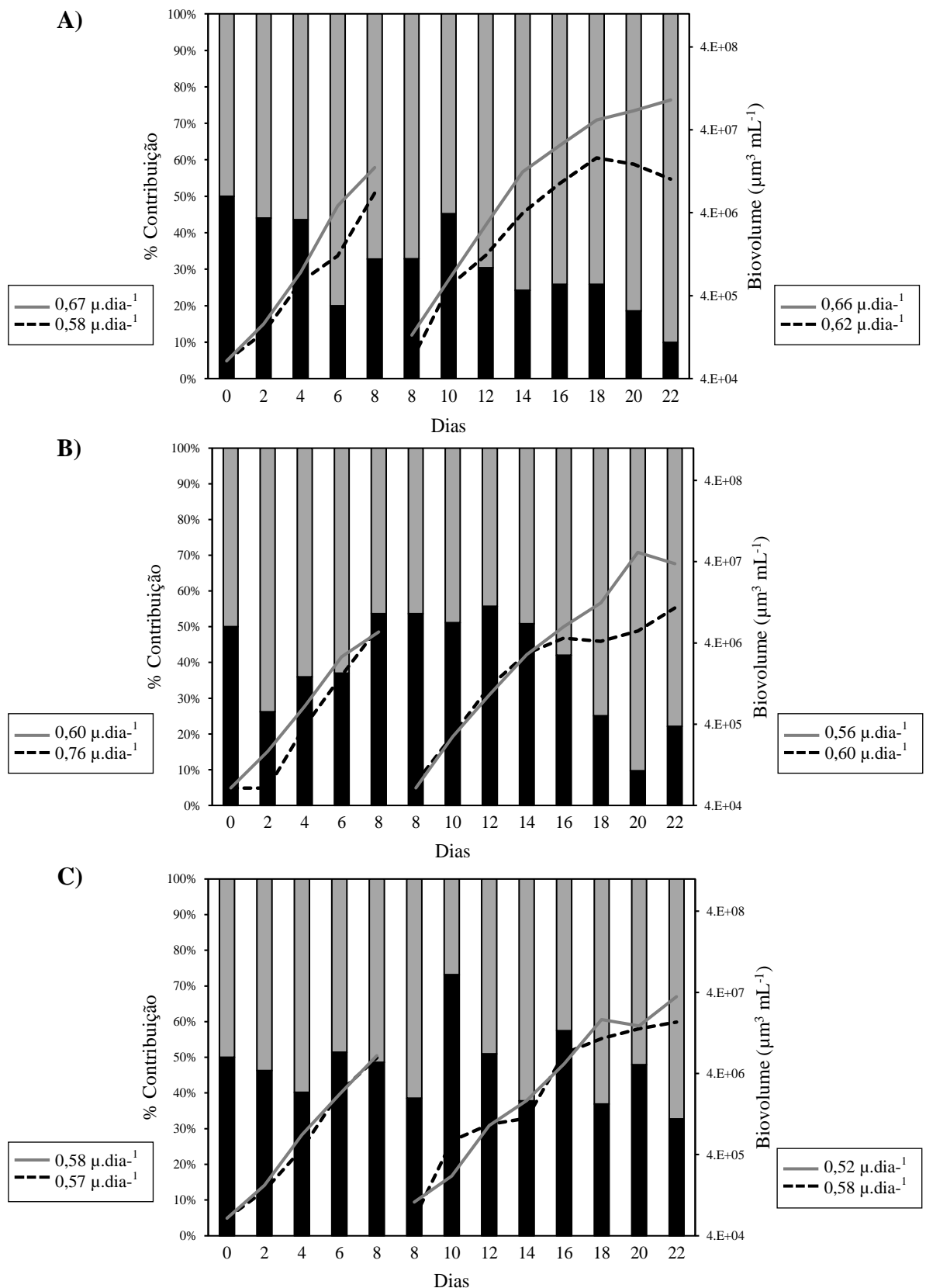
crescimento observadas em cada condição no tempo 1 (lado esquerdo) e no tempo 2 (lado direito).



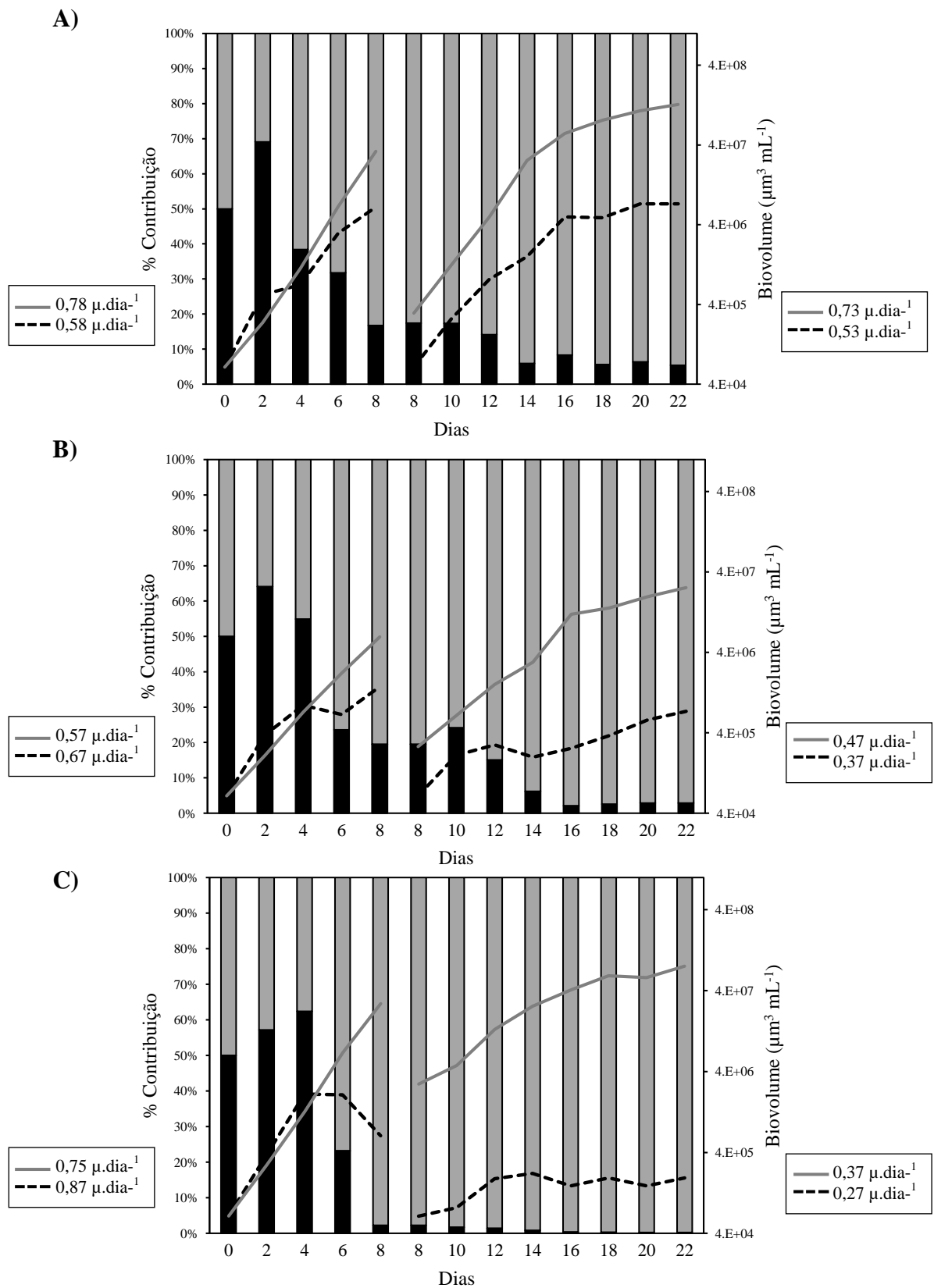
**Fig. 2:** Influência da interação entre os fatores pH, aeração e bicarbonato sobre as taxas de crescimento (Tempos 1 e 2). **A)** Cultivos sem bicarbonato; **B)** Cultivos com bicarbonato. NPLJ-4 (*M. aeruginosa*) e ITEP-A1 (*C. raciborskii*) representam os cultivos controle; C NPLJ-4 (*M. aeruginosa*) e C ITEP-A1 (*C. raciborskii*) representam os cultivos em competição. Barras correspondem ao intervalo de confiança de 95%.



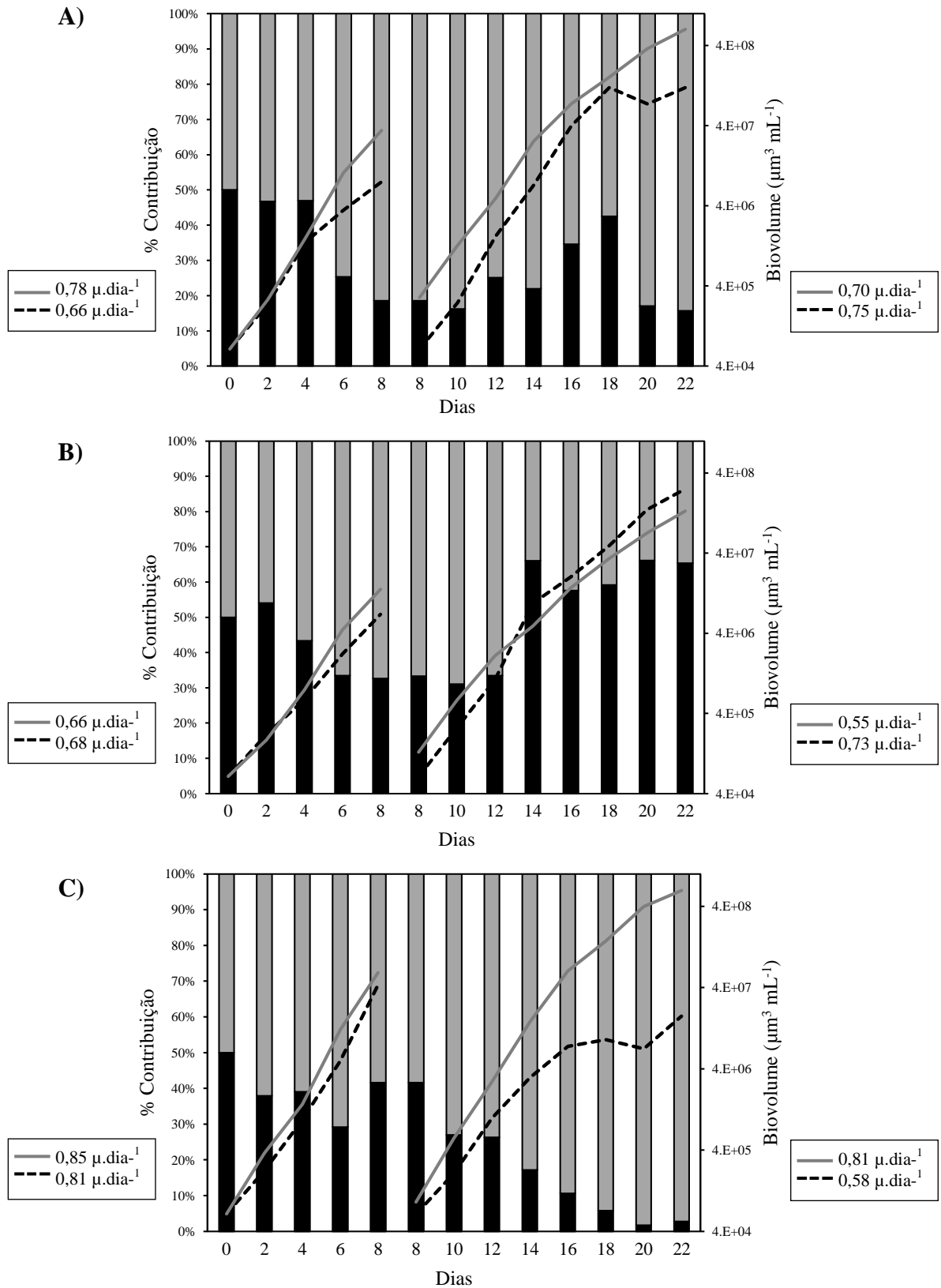
**Fig. 3:** Porcentagem de contribuição em biovolume (barras) e curva de crescimento (linhas) para cada espécie nos cultivos de competição sem bicarbonato e com aeração sob pH 8,2 (A), 6,8 (B) e livre (C). Barra e linha cinzas representam *M. aeruginosa*; Barra e linha tracejada pretas representam *C. raciborskii*. Quadro do lado esquerdo: taxa média de crescimento no tempo 1; Quadro do lado direito: taxas média de crescimento no tempo 2



**Fig. 4:** Porcentagem de contribuição em biovolume (barras) e curva de crescimento (linhas) para cada espécie nos cultivos mistos sem bicarbonato e sem aeração sob pH 8,2 (A), 6,8 (B) e livre (C). Barra e linha cinzas representam *M. aeruginosa*; Barra e linha tracejada pretas representam *C. raciborskii*. Quadro do lado esquerdo: taxa média de crescimento no tempo 1; Quadro do lado direito: taxas média de crescimento no tempo 2.



**Fig. 5:** Porcentagem de contribuição em biovolume (barras) e curva de crescimento (linhas) para cada espécie nos cultivos de competição com bicarbonato e sem aeração sob pH 8,2 (A), 6,8 (B) e livre (C). Barra e linha cinzas representam *M. aeruginosa*; Barra e linha tracejada pretas representam *C. raciborskii*. Quadro do lado esquerdo: taxa média de crescimento no tempo 1; Quadro do lado direito: taxa média de crescimento no tempo 2.



**Fig. 6:** Porcentagem de contribuição em biovolume (barras) e curva de crescimento (linhas) para cada espécie nos cultivos de competição com aeração e com bicarbonato, sob pH 8,2 (A), 6,8 (B) e livre (C). Barra e linha cinzas representam *M. aeruginosa*; Barra e linha tracejada pretas representam *C. raciborskii*. Quadro do lado esquerdo: taxa média de crescimento no tempo 1; Quadro do lado direito: taxas média de crescimento no tempo 2.



## ANEXO

### NORMAS DA REVISTA *FRESHWATER BIOLOGY*



#### *Author Guidelines*

#### **PRESENTATION OF MANUSCRIPTS**

A single file should be prepared containing the title page, summary, text, acknowledgments, references and tables (see guidelines below). Additional files may be created for each figure. Microsoft Office 2007/2010 file formats (i.e. .docx, .xlsx etc.) are acceptable on SIM.

- Please leave the right-hand margin unjustified
- Turn the hyphenation option off
- Use tabs, not spaces to separate data in tables

(a) *Title page.* This should include the title, list of authors names, institute or laboratory of origin, name, postal address and email address of the author to whom proofs should be sent, an abbreviated title for use as a running head line and five keywords, which should be relevant for literature searching and each normally comprising not more than two words.

(b) *Summary.* All papers should include a summary, in short numbered paragraphs, limited to about 3% of the length of the text, and in any case to not more than 500 words. This should provide a concise statement of the scope of the work and its principal findings and be fully intelligible without reference to the main text.

(c) *Introduction.* This should contain a clear statement of the reason for doing the work, outlining essential background information but should not include either the results or conclusions.

(d) *Methods.* This should be concise but provide sufficient details to allow the work to be repeated. **Product and manufacturer names:** Where specific named materials/products are mentioned or named equipment used (including software packages), these should be identified by their manufacturer, followed by the manufacturer's location (e.g. town, state, country), or a source reference should be given if a standard or replicated procedure is being followed.

(e) *Results.* This should not include material appropriate to the Discussion.

(f) *Discussion.* This should highlight the significance of the results and place them in the context of other work.

(g) *Acknowledgments.*

(h) *References.*

(i) *Tables.*

(j) *Figure legends.*

(k) *Illustrations.* The original drawings should not be sent until the Editor requests them. Please see section '[Tables, Figures and Illustrations](#)' for further information on electronic submission of artwork.

There are no formal limits to the length of papers, but page space in the journal is tight, and most papers (except review articles) should be no longer than 9,000 words in total (text plus references, excepting Figs and Tables).

### **ABBREVIATIONS AND UNITS**

Full names with uncommon abbreviations must be given with the first mention; new abbreviations should be coined only for unwieldy names and should not be used at all unless the names occur frequently. In the title and summary unusual abbreviations should be identified, in the introduction and discussion they should be used sparingly. SI units are preferred. Contributors should consult the Royal Society pamphlet *Quantities, Units and Symbols* (1975) and the IBP pamphlet *Quantities Units and Symbols for IBP Synthesis* (1975).

### **SCIENTIFIC NAMES**

The complete scientific name (genus and species) should be cited for every organism when first mentioned. Family names should also be given, either in parentheses or as part of the text ("... the perlid stonefly *Acroneuria lycorias* ..."). Subsequent to its first appearance in the text, the generic name may be abbreviated to an initial except where intervening references to other genera would cause confusion. Common names of organisms, if used, must be accompanied by the correct scientific name on first mention. These common names should be in lower case, unless they are named after a geographical location or a person (i.e. unless they contain a proper noun): for example, Canada goose and Romer's frog, but brown trout and snapping turtle. Scientific (i.e. Latin) names should be italicized.

Naming authorities need not be given, except in cases where the species identity is a focus of the scientific content (for instance where identity is being established, or is controversial or in question). In such cases naming authorities should be given only on first mention and should not be given in the title or summary. Tables are often useful in collating specific names and, if used in this way, should be referred to early in the text.

### **REFERENCES**

**References in articles** - We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

In the text, references should be made by giving the author's name with the year of publication, with one or both in parentheses. Thus, 'Smith (2002) found that...' OR 'Fish were found mainly in deep water (Smith, 2002)'. The same style is used for two-author papers. When reference is made to a work by three authors, all names should be given when cited for the first time and thereafter using only the first name and adding "*et al.*". For four or more authors, the first name followed by "*et al.*" should be used on all occasions. If several papers by the same author(s) and from the same year are cited -- a, b, c, etc., should be put after the year of publication. In the reference list, provide all authors for papers with six and fewer authors. For papers with more than six authors, list the first six authors followed by "*et al.*".

References should be listed in alphabetical order at the end of the paper in the following standard form:

Avise J.C. (1994a) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.

Avise J.C. (1994b) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. PhD Thesis, Chapman University, New York.

Cornut J. E., Elger A., Lambrigot D., Marmonier P. M. & Chauvet E. (2010) Early stages of leaf decomposition are mediated by aquatic fungi in the hyporheic zone of woodland streams. *Freshwater Biology*, **55**, 2541-2556.

Simon C. (1991) Molecular systematics at the species boundary. In: *Molecular Techniques in Taxonomy* (Eds G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston & J.P.W. Young), pp. 33–71. NATO ASI Series, Vol. 57. Springer-Verlag, Berlin.

Simon C. (1992) Molecular systematics. In: *Proceedings of First International Symposium on Molecular Techniques in Taxonomy* (Ed. J.C. Avise), pp. 23–34. Denton, Texas, 4–6 November 1992. Springer, Berlin.

Titles of journals should not be abbreviated. Unpublished material, except for PhD theses, should not be included among the references, but should be cited as 'X. Xxxxx, unpubl. data' in the text.

## TABLES, FIGURES AND ILLUSTRATIONS

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals with a fully informative caption as a heading. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. Vertical lines should not be used to separate columns. Electronic tables should be provided in an editable format (.rtf or .doc). All illustrations (including photographs) are classified as figures and should be numbered consecutively.

Authors should submit artwork electronically. **Photographs** should be saved at 300 d.p.i. in TIF format, or in JPG format with low compression. **Line figures** should preferably be submitted in vector graphics format, and either embedded as such in a Word document or saved in PDF or EPS format. If this is not possible, they should be saved separately as pixel-based graphics at 600 d.p.i. (at the required print size) and saved in TIF (not JPG) format, or embedded as such in a Word document. **Combination figures** (e.g. with photographic and line/text content) should be prepared as for line figures. For help in preparing your figures please go to our Electronic Artwork Information page [here](#).

In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

## COLOUR ILLUSTRATIONS

Authors can elect to have colour illustrations in only the online version of their published manuscript, while having them reproduced in black-and-white in the printed version, free of charge. In this case, (a) both a colour version and a black-and-white version of the figure

should be uploaded, and (b) the figure legend should not refer to colour as it will be used for both print and online versions.

If authors elect to have colour figures published in the printed journal, it is the policy of Freshwater Biology for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. The cost of colour printing is 150 GBP for the first figure and 50 GBP for each subsequent figure.

Following acceptance, a signed copy of the completed Colour Work Agreement Form must be sent to Customer Services before colour work can be processed. This form is required only for figures to be processed in colour in print and can be downloaded as a PDF [here](#). If you are unable to download the form, please contact the Production Editor at [fwb@wiley.com](mailto:fwb@wiley.com) and you will be emailed or faxed a form.

The Colour Work Agreement Form must be returned ONLY by post to the Publisher's office.

Publisher's office:

Customer Services (OPI)

John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

UK

For queries pertaining to colour figure charges, please contact the Production Editor.

## **SUPPORTING INFORMATION**

Supporting Information can be published as web materials on the Freshwater Biology web site at the Editor's discretion. Note that if material is integral to the article it should be published as part of the article and not as Supporting Information. Supporting Information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. Supporting Information may include raw data in tables, more detailed versions of tables containing information of use to specialists but not necessary to understand the article, long species lists, detailed site information and distribution maps, descriptions of complex models, worked examples of complex statistical procedures, etc. Where there is Supporting Information, the printed paper will carry a brief title succinctly describing the contents of each item (e.g. Fig. S1, S2; Table S1 etc). It should not normally exceed 50 words. Such brief titles should be listed together after the references section of the main paper. A full, self explanatory title, with further details and definitions, should then accompany the Supporting Information file itself, and will appear in the online version of the paper only. In preparing the main text, Supporting Information should be cited just as other Figs and Tables. On first mention, please cite as, for instance "... (see Appendix S1 in Supporting Information). Subsequent references to further items of Supporting Information can be cited as, for instance, "... (see Table S1).

In order to provide long term access to Supporting Information, such material must be mounted on the Freshwater Biology web site rather than on authors' sites. The Supporting Information will be accessible by hot links from the on-line version of Freshwater Biology. Authors should note that Supporting Information is merely 'linked' to the article but will not be organised into any easily searched database; nor will it be subject to copy-editing. Authors are responsible for the preparation of Supporting Information, which should be supplied in a format that will be most accessible by readers. It is published as supplied by the author and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For more information, please see our guidelines at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>. Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database, such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh ([www.freshwaterbiodiversity.eu](http://www.freshwaterbiodiversity.eu)).