

MAURO CESAR PALMEIRA VILAR

**EFEITO DO BALANÇO pH/CARBONO INORGÂNICO EM PARÂMETROS
ECOFISIOLÓGICOS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA)
SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

RECIFE-PE

2015

MAURO CESAR PALMEIRA VILAR

**EFEITO DO BALANÇO pH/CARBONO INORGÂNICO EM PARÂMETROS
ECOFISIOLÓGICOS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA)
SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Ecologia.

Orientador: Dr. Renato José Reis Molica (UFRPE/UAG)

Co-orientador(a): Dra. Ariadne do Nascimento Moura (UFRPE/DB)

RECIFE-PE

2015

Efeito do Balanço pH/Carbono Inorgânico em Parâmetros Ecofisiológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) sob Condições Experimentais

Mauro Cesar Palmeira Vilar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Ecologia.

Dissertação apresentada e _____ em ____/____/____

Orientador:

Prof. Dr. Renato José Reis Molica (UFRPE/UAG)

Examinadores:

Dr. Ênio Wocyli Dantas (UEPB/CCBSA)
(1º Membro)

Dr. Mauro de Melo-Júnior (UFRPE/UAST)
(2º Membro)

Dra. Nísia Karine Cavalcanti Aragão-Tavares (UFRPE/DB)
(3º Membro)

Suplente:

Dra. Ana Carla Asfora El-Deir (UFRPE/DB)

Ficha Catalográfica

V695e Vilar, Mauro Cesar Palmeira
Efeito do balanço pH/carbono inorgânico em parâmetros
ecofisiológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii*
(Cyanobacteria) sob condições experimentais / Mauro Cesar
Palmeira Vilar. – Recife, 2015.
68 f.: il.

Orientador(a): Renato José Reis Molica.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ecologia) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Biologia, Recife, 2015.
Referências.

1. Carbono inorgânico 2. Crescimento 3. Fitoplâncton
I. Molica, Renato José Reis, orientador II. Título

CDD 574.5

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, amigos e mestres, pelos ensinamentos e experiências compartilhados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido que tudo isso acontecesse. Sem a sua permissão, certamente eu não teria chegado aqui. À minha família por todo o apoio e confiança depositados em mim; especialmente aos meus pais Maria do Carmo e Walter e meus avós Berenita, Ivonete, Rosemiro (*in memoriam*) e Adeilda (*in memoriam*). Também agradeço às minhas tias Rosinete, Verônica, Ceça e, principalmente, tia Rita que sempre me motivou a seguir em frente e nunca hesitou em me ouvir e me dar os seus valiosos conselhos. Meus irmãos (Lucas, Murilo e Davi), primos (Lucas, Bentinho, Vitinho, Matheus, Mel, Júnior, Adriana e Michelle) pelos momentos de entretenimentos e descontração que me proporcionaram, tornando a caminhada menos árdua. Agradeço a Zeca pelos seus ensinamentos e confiança e a Lu por ‘quebrar meus galhos’ durante as viagens de congresso, rs. Amo todos vocês!!!

Ao meu orientador Renato José Reis Molica por todos os ensinamentos, confiança e contribuições que não se limitaram ao conhecimento científico-acadêmico, mas à vida como um todo. Tenho muito orgulho de ter o nome MOLICA associado ao meu nome. Agradeço também à minha co-orientadora, primeira orientadora e eterna conselheira Ariadne do Nascimento Moura. Sou muito grato pelo Biólogo (Cianobacteriologista, rs) que me tornou e todos ensinamentos que me foram passados.

Agradeço imensamente aos professores Ulysses Albuquerque, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, Geraldo Jorge, Aloysio Ferrão-Filho, Mauro Mélo-Jr, Thiago Gonçalves, Ênio Dantas, Raquel Lira, Elcida Araújo, Nicola Schiel e, especialmente, Ana Carla pela compreensão e seu jeito doce que me acalmou nos momentos mais tensos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia pela minha formação, especificamente à Professora Paula Braga que é uma pessoa INCRÍVEL e de um CORAÇÃO IMENSO, com quem eu sempre pude contar para resolver todas minhas ‘brincas’ e ter uma palavra amiga nos momentos mais difíceis. Desde a graduação a minha admiração só aumentou. Foi uma ótima coincidência tê-la como minha professora e coordenadora no mestrado.

Aos meus amigos os quais posso chamar de irmãos: Josivan Soares, Felipe Cavalcante, Felipe Torres, Mayara Barbosa, Mayara Pessoa, Erika Flávia, Aline Spíndola, Liliane Vilela, Milla Maria, Mariana Silva, Mariana Sena, Danilo Barros e

Thalyta Maria. Meus amigos do PPGE, que hoje posso chamar de cúmplices e parceiros para todas as horas: Pipas Abreu, Rafa Souza, Marilian Boachá, Deuza, Shalana Castro e Fernando Sena. Vocês foram essenciais pra mim. Os aqui citados e, infelizmente esquecidos, estão todos no meu coração.

Agradeço também aos outros amigos irmãos e representantes do Laboratório de Biotecnologia que tive a oportunidade fazer durante a minha estada em Garanhuns os quais chamo carinhosamente de *Best*: Wellington Leal, Talita Camila, William Xavier, Jamilly Barros, Daniele Ribeiro, Glêce Milene, “Guepardo” Montalvo (meu *Personal Statistical*), Celina, Rodrigo Martins, Vinícius Cooper, Paula Maciel, Paula Medeiros, Elaina, Catarina Ramos, Profa. Diana Vasconcelos, em especial a Ricardo Virgínio e Vitor Marques por serem meus *roomies*.

Aos membros e ex-membros do LABFIC e pessoal da Botânica, Nísia Aragão-Tavares, Micheline Cordeiro, Kênia Muniz e minha primeira orientada, com quem tive a oportunidade de compartilhar diversas experiências Karine Gomes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pela bolsa concedida; Universidade Federal Rural de Pernambuco, minha eterna casa, e Unidade Acadêmica de Garanhuns por ter sido minha nova casa e ter me acolhido nessa cidade maravilhosa de clima agradável.

Enfim, o meu MUITO OBRIGADO a todos que participaram direta ou indiretamente da construção deste trabalho e da minha formação como profissional e cidadão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Cianobactérias e sua dominância nos corpos d'água.....	15
2.2. Respostas do fitoplâncton à estabilidade hidrológica e balanço pH/CO ₂	16
2.3. Aspectos ecofisiológicos de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	18
Referências Bibliográficas.....	20
Artigo: Efeitos do balanço pH/carbono inorgânico no crescimento de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Cyanobacteria).....	30
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	34
3. Resultados.....	36
4. Discussão.....	42
5. Conclusões.....	46
6. Agradecimentos.....	46
7. Referências Bibliográficas.....	46
ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Diagrama conceitual das principais interações químicas e biológicas (microalgas) envolvendo a competição por carbono inorgânico na água (Van de Wall et al. (2011)).....17

ARTIGO

Figura 1. Curvas de crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP-A1 cultivada sob pH 6,8 (A), 8,2 (B) e livre (C) com e sem aeração. Barras representam o desvio padrão.....50

Figura 2. Taxas de crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP A1 cultivada em pH livre, 6,8 e 8,2 com (A) e sem (B) aeração. Barras representam o desvio padrão e letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, $P<0,05$).....51

Figura 3. Quota celular de carbono adquirido por *C. raciborskii* ITEP A1 em diferentes faixas de pH e condições de cultivo. Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, $P<0,01$).....51

Figura 4. Rendimento em biomassa adquirido por *C. raciborskii* ITEP A1 em diferentes faixas de pH e condições de cultivo. Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, $P<0,01$).....52

Figura 5. Evolução do pH (A) e carbono inorgânico (B) no experimento sob pH livre. Barras representam o desvio padrão.....53

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. ANOVA fatorial de medidas repetidas ($P < 0,01$) avaliando o crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP-A1 das diferentes condições (com e sem aeração) e tratamentos (pH livre, 6,8 e 8,2).....54

Tabela 2. Traços morfológicos (n=30) (V = volume celular médio; S = área celular; S/V = razão área/volume; DLM = Dimensão linear máxima do tricoma), Rendimento da biomassa ($\mu\text{g C L}^{-1}$) (n=3) e quota de carbono celular (pg C célula^{-1}) (n=30) de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP A1 cultivada em diferentes faixas de pH, com (a) e sem aeração (b). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Dados em negrito representam diferenças significativas (Tukey; $P < 0,05$).....55

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

CO₂ – Dióxido de carbono

H₂CO₃ – Ácido carbônico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCO₃⁻ – Bicarbonato

CO₃⁻² – Carbonato

pCO₂ – Pressão parcial do dióxido de carbono

MCC – Mecanismo de Concentração de Carbono

ANOVA – Análise de Variância

pH – Potencial hidrogeniônico

BMAA – β-Metilamino-L-Alanina

N₂ – Nitrogênio atmosférico

NO₃⁻ – Nitrato

NO₂⁻ – Nitrito

OH – Radical hidroxila

NH₃ – Amônia (Amoníaco)

NH₄ – Amônio

Vilar, Mauro Cesar Palmeira (M.Sc). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Julho, 2015. Efeitos do balanço pH/carbono inorgânico em parâmetros ecofisiológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) sob condições experimentais. Orientador: Prof. Dr. Renato José Reis Molica (UFRPE-UAG). Co-orientadora: Profa. Dra. Ariadne do Nascimento Moura (UFRPE).

RESUMO - *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolozynska) Seenayya & Subba Raju é uma espécie diazotrófica cosmopolita, potencialmente tóxica e considerada invasora em diferentes latitudes. A capacidade de ocupar diferentes nichos é uma característica que está ligada às suas peculiaridades fisiológicas, as quais permitem que possua uma elevada amplitude ecológica para diferentes variáveis ambientais. No entanto, em condições de cultivo, essa espécie pode apresentar limitações para o crescimento relacionadas ao pH, temperatura e nutrientes. Neste cenário, o presente trabalho objetivou investigar o efeito do pH e fonte de carbono inorgânico em parâmetros relacionados ao crescimento de *C. raciborskii*. A cepa ITEP-A1 (produtora de saxitoxinas) foi cultivada em meio de cultura ASM-1 e mantida sob condições controladas. O delineamento experimental consistiu do cultivo da linhagem ITEP-A1 em diferentes faixas de pH e disponibilidade de carbono inorgânico, com e sem aeração. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 2 L com 1,5 L de meio de cultura e foram analisadas curvas e taxas de crescimento, traços morfológicos, aquisição de biomassa, temperatura, pH, condutividade, alcalinidade e carbono inorgânico total dissolvido. Os resultados foram comparados usando ANOVA fatorial com medidas repetidas e ANOVA unifatorial com Teste de Tukey *a posteriori*, sendo as análises estatísticas e gráficos realizados no programa Statistica 7.0 e R i386 3.1.2, respectivamente. *C. raciborskii* ITEP-A1 apresentou melhor taxa de crescimento e biomassa sob pH alcalino (>8,0), em ambas condições de aeração. Na condição de pH > 8,0 e com aeração, o íon bicarbonato (HCO_3^-) foi a principal fonte de carbono inorgânico disponível ao processo fotossintético, o que favoreceu o crescimento de *C. raciborskii*. Tais resultados podem ser extrapolados para uma escala global, e sugeridos como fatores que têm favorecido a distribuição, bem como expansão dessa cianobactéria para outras latitudes.

Palavras-chave: CO₂, crescimento, fitoplâncton.

Vilar, Mauro Cesar Palmeira (M.Sc). Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). Julho, 2015. Effects of pH/inorganic carbon balance on ecophysiological parameters of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) under experimental conditions. Supervisor: Dr. Renato José Reis Molica (UFRPE-UAG). Co-supervisor: Dr. Ariadne do Nascimento Moura.

ABSTRACT - *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolozynska) Seenayya & Subba Raju is a cosmopolitan diazotrophic and potentially toxic specie considered as invasive in different latitudes. Its capacity of occupying several niches is a feature which is linked to its physiological traits, which allow it to have wide ecological amplitude to several environmental parameters. However, in laboratory conditions that specie might show some growth limitations related to pH, temperature and nutrients. In this scenario, this work aimed to investigate the effect of pH and source of inorganic carbon in growth-related parameters of *C. raciborskii*. The strain ITEP-A1 (saxitoxin-producing) was cultured in ASM-1 medium and maintained under controlled conditions. Experiments were worked out in 2L erlenmeyers filled with 1.5 L culture medium in different pH ranges and inorganic carbon availability, with/without CO₂ enriched-air bubbling. Cyanobacterial growth, morphological traces, biomass acquisition, temperature, pH, conductivity, alkalinity and total inorganic carbon dissolved were analyzed. Results were compared using repeated-measures ANOVA and ANOVA *one way* with Tukey's test *post hoc* ($p < 0.05$). Graphics and statistical analysis were performed in Statistica 7.0 and R i386 3.1.2, respectively. *C. raciborskii* ITEP-A1 showed better growth rate and biomass under alkaline pH (> 8.0) ($P < 0,05$) in both aeration conditions. pH, alkalinity and inorganic carbon showed an increasing trend throughout the experiment under pH free. At the pH condition > 8.0 with aeration the bicarbonate ion (HCO₃⁻) was the main source of inorganic carbon available to the photosynthetic process, which favored *C. raciborskii* growth. These results can be extrapolated to a global scale, and suggested as factors that have favored the distribution and expansion of this cyanobacterium to other latitudes.

Key-words: CO₂, growing, phytoplankton.

INTRODUÇÃO GERAL

No cenário atual de mudanças climáticas e degradação dos recursos hídricos, a ocorrência de florações de cianobactérias vem sendo cada vez mais frequente, em razão, principalmente, da intensificação do processo de eutrofização artificial dos ecossistemas aquáticos (TUNDISI, 2005). No Brasil, destacam-se os gêneros *Microcystis*, *Dolichospermum/Anabaena*, *Planktothrix* e a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju como os que mais frequentemente dominam nos corpos d'água (BONILLA et al 2012; SOARES et al 2013), sendo esta última bastante relevante por ser uma espécie invasora de distribuição cosmopolita, tendo sido originalmente descrita na região de Java (Indonésia).

A hipótese de sua ampla radiação adaptativa tem sido suportada pelos registros de ocorrência em diferentes regiões do globo, como zonas tropicais (DANTAS, BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOURA 2010; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al 2014), subtropicais (ANTENUCCI et al. 2005; STITZ, KINNEAR e FABBRO, 2013) e temperadas (KOKOCINNSKI et al 2010). Algumas cepas podem produzir potentes citotoxinas, tais como cilindrospermopsina, ou neurotoxinas, como saxitoxinas e BMAA, as quais têm implicações na saúde humana e animal (SAKER et al 1999; LAGOS et al 1999; DITTMANN, FEWER e NEILAN, 2013). Assim, esta espécie tem atraído a atenção da comunidade científica e órgãos gestores da qualidade da água.

Estudos experimentais e *in situ* vêm sendo desenvolvidos a fim de entender as condições ambientais que atuam como 'gatilho' de respostas funcionais associadas à dominância de *C. raciborskii* nos corpos d'água (PADISÁK 1997; BOUVY et al 2000; BONILLA et al 2012). Padisák (1997) atribui o sucesso ecológico e expansão global desta cianobactéria a características como: capacidade de se deslocar na coluna d'água através dos aerótopos; tolerância à baixa luminosidade; capacidade de fixar o N₂, elevada afinidade à amônia e fósforo, e resistência à herbivoria pelo zooplâncton, em razão de tricomas longos e produção de metabólitos tóxicos.

Além disso, Bonilla et al (2012) ressaltam que a plasticidade fenotípica de *C. raciborskii* é uma vantagem essencial à sua expansão em diferentes latitudes, uma vez que permite a tolerância a uma ampla faixa de parâmetros ambientais, sobretudo temperatura. Outras investigações descrevem a persistência de elevadas biomassas da espécie em condições de estabilidade (STITZ, KINNEAR e FABBRO, 2013), bem como durante períodos de mistura da coluna d'água (DANTAS, MOURA e

BITTENCOURT-OLIVEIRA 2011). Tais informações reforçam a hipótese de Connell (1978) (distúrbio intermediário), a qual considera que na ausência ou sob um baixo nível de distúrbios (*long steady state*), a exclusão competitiva reduziria a diversidade ao menor nível.

Apesar de existir uma forte relação entre o processo de eutrofização e a ocorrência de florações de cianobactérias, a resposta de assembleias fitoplanctônicas não depende apenas da disponibilidade de nutrientes, mas da demanda da produtividade na totalidade dos recursos (MOSS, 1973). As investigações de Tilman et al (1982) e Smith (1983) foram preponderantes para entender que a relação N/P desempenha um papel importante na estrutura da comunidade. No entanto, sabe-se que o metabolismo desses nutrientes, tende a gerar um aumento do pH, e, conseqüentemente, influenciar na fonte de carbono inorgânico disponível à fotossíntese (balanço pH/CO₂) (SHAPIRO 1984; 1990; 1997). Subseqüentemente, uma notável sucessão (*shift*) na comunidade algal pode ser observada, onde algas verdes são geralmente substituídas por cianofíceas (SHAPIRO 1984). Dessa forma, estudos têm tentado verificar as respostas de cianobactérias a variações no pH e na disponibilidade de CO₂. Neste contexto, *C. raciborskii* tem sido um dos principais modelos investigados, a fim de entender o seu sucesso na expansão e dominância em ecossistemas aquáticos de diferentes latitudes (HOLLAND et al 2012).

Zevenboom (1987) já afirmava que estudos experimentais que abordem características ecofisiológicas de espécies fitoplanctônicas são importantes, pois permitem o conhecimento sobre estratégias e fatores que estimulam a resposta adaptativa dessas, as quais tornam as extrapolações para a natureza, mais realísticas. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido a fim de testar hipóteses que tratam da influência do balanço pH/CO₂ em parâmetros do crescimento de *C. raciborskii*. Tais hipóteses foram geradas a partir de informações de estudos desenvolvidos em campo, bem como experimentos de laboratório.

REVISÃO DE LITERATURA

Cianobactérias e sua dominância nos corpos d'água

Cianobactérias constituem um grupo de microrganismos procariontes autotróficos, capazes de colonizar diferentes tipos de ambientes (WHITTON e POTTS 2000). A persistência de elevadas biomassas desses organismos nos corpos d'água tem sido associada a elevadas temperaturas, baixa concentração de CO₂ (pH > 7,0), bem como maior disponibilidade de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, provenientes do processo de eutrofização (DOKULIL e TEUBNER 2000).

Tendo se intensificado a partir da década de 40, a eutrofização tem sido tradicionalmente indicada como um dos principais fatores que favorecem a formação de florações algais. Entretanto, recentemente tal fenômeno tem sido estudado também na perspectiva das mudanças climáticas globais, que têm influenciado diretamente no padrão de pluviosidade, aumento da temperatura em diferentes latitudes (CAREY et al 2012; REICHWALDT e GHADOUANI 2012; EKVALL et al 2013), e na dinâmica do pH – carbono inorgânico (SHAPIRO 1984; 1997).

Investigações sobre a relação entre eventos de dominância e as variáveis ambientais têm sido desenvolvidas por alguns autores em regiões tropicais, como Dantas et al (2011) e Moura et al (2011) que relacionaram os parâmetros abióticos à dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos (PE, Brasil), verificando que em ambos períodos de estratificação/desestratificação térmica da coluna d'água, espécies reguladoras de fluatibilidade como *Planktothrix agardhii* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, foram predominantes, formando florações perenes multiespecíficas.

Além disso, sabe-se que apesar de possuírem nichos similares, cianobactérias possuem estratégias ecofisiológicas ajustadas às características ambientais, o que permite o sucesso de diferentes gêneros nos corpos d'água. Mur et al (1999) as classificam como: espécies fixadoras de N₂, de estratificação, ambientes misturados, formadoras de espuma, bentônicas e coloniais picoplanctônicas. Tal abordagem ecológica permite o entendimento e predição da distribuição das espécies ao longo de gradientes ambientais (LITCHMAN et al 2010). Baseando-se no estudo de traços ecofisiológicos, O'Farrel, Bordet e Chaparro (2012) investigaram a dinâmica sazonal da taxocenose de cianobactérias ao longo de um eixo longitudinal no reservatório Salto Grande (Uruguai) – de 2006 a 2011. Os autores observaram a co-existência de espécies formadoras de espuma e diazotróficas, estando estas relacionadas à estabilidade e

temperatura na coluna d'água, respectivamente. Além disso, ressalta-se a grande relevância de tais estudos para regiões tropicais e subtropicais onde se registram uma elevada ocorrência de florações algais (MOWE et al 2015).

Em sua maioria, cianobactérias formadoras de florações e *mats*¹ são potencialmente tóxicas, sendo capazes de produzir compostos químicos que diferem de acordo com a sua atividade biológica, sendo classificadas como hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas, BMAA), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lingbiatoxina, aplisiatoxina e lipopolissacarídeos de parede celular) (DITTMANN, FEWER e NEILAN 2013).

A dinâmica de cianotoxinas no ambiente ainda tem sido pouco compreendida, uma vez que o seu papel ecológico não está bem esclarecido. As possíveis vantagens evolucionárias da produção de toxinas são abordadas no trabalho de Holland e Kinnear (2013) que discutem a importância desses metabólitos para o sucesso competitivo, através de efeitos alelopáticos, toxicidade e persistência; e/ou 'facilitadores fisiológicos', no aprimoramento de atividades metabólicas, tais como eficiência fotossintética. Assim, reforça-se a importância de estudos que verifiquem os fatores relacionados à dominância de cianobactérias e produção de toxinas.

Respostas do fitoplâncton à estabilidade hidrológica e balanço pH/CO₂

Muito tem se discutido na literatura científica sobre o uso da 'estabilidade' como medida de propriedade emergente no ecossistema, bem como sua relação com as perturbações naturais (BORICS, VÁRBÍRÓ e PADISÁK 2013). No corpo d'água, a estabilidade é influenciada pela morfometria, ciclo hidrológico, vento, mudança no padrão térmico na coluna d'água, ou a mecanismos induzidos, como a aeração (HAYNES 1973; PASTOROK et al 1981; ASHLEY 1981; COWELL et al 1987; CARRICK et al 1993; BEUTEL 2006; JUNGO et al 2001; STITZ, KINNEAR e FABBRO 2013). Tais variações ocorrem em diferentes escalas, mediando processos de sucessão nas biocenoses aquáticas, sobretudo no fitoplâncton, cujas populações apresentam elevada sensibilidade a discretas flutuações ambientais (COSTA et al 2004). Tais respostas funcionais são importantes na verificação de hipóteses e teorias para o entendimento de processos e padrões ecológicos.

¹ O *algal mat* é uma camada de algas geralmente filamentosas, dispostas em 'tapete', que crescem em substratos bentônicos ou perifíticos, podendo ser marinhos ou de água doce.

No atual cenário das mudanças climáticas globais associadas à intensa emissão de gases na atmosfera, muitos estudos têm objetivado entender a influência de eventos hidroclimáticos no fitoplâncton (BOUVY et al 2003; DEVERCELLI et al 2006; HENRY et al 2006), sobretudo na relação entre a dominância de cianobactérias com a estabilidade hidrológica e o equilíbrio do CO₂ na água. Em regiões de clima semiárido, onde se observa forte influência do período de estiagem, a construção de reservatórios tem sido frequente. Nesses ambientes, a profundidade, elevadas temperaturas, tempo de residência da água e comportamento polimítico do ecossistema, favorecem o estabelecimento de florações (SOUZA-FILHO, MARTINS e PORTO 2006; DANTAS, MOURA e BITTENCOURT-OLIVEIRA 2011; ROMO et al 2013).

Brokes e Carey (2011) consideram que a atenuação da luz, em consequência de um aumento na biomassa algal, modifica a distribuição vertical da radiação na coluna d'água, o que promove a estratificação térmica e estabelece um ambiente estável (*steady state*) para a formação de florações de cianobactérias. Por exemplo, Antenucci et al (2005) e Stitz, Kinnear e Fabbro (2013) verificaram a persistência de elevadas densidades de *C. raciborskii* em condições de estabilidade da coluna d'água em reservatórios subtropicais (Austrália). Durante o regime de mistura, pode-se observar a variação abrupta na luminosidade, temperatura e nutrientes (JI 2008), provenientes do sedimento e do metabolismo hipolimnético; além de um aumento na difusão de gases na interface água-ar. Tais alterações interferem diretamente no balanço cátion-aniônico por meio de flutuações no pH e alcalinidade, os quais influenciam na disponibilidade do carbono inorgânico dissolvido (CO₂, HCO₃⁻ e CO₃⁻²).

Diferentes grupos algais estão fisiologicamente ajustados a faixas específicas de pH/CO₂ (**Figura 1**). Tal constatação tem sido demonstrada por estudos com espécies que apresentam diferentes cinéticas de absorção de CO₂ (AZOV 1982; SHAPIRO 1997; HOPKINSON et al 2011; VAN DE WAAL et al 2011; CARNEIRO, PACHECO e AZEVEDO 2013). Os estudos de King (1970; 1972) foram pioneiros em investigar a interferência do pH/CO₂ em cianobactérias. Posteriormente, Shapiro (1984; 1990; 1997) desenvolveu experimentos para testar as hipóteses de King, as quais assumem que (i) uma diminuição na concentração de CO₂ em virtude da atividade fotossintética de outras algas proporcionaria um ambiente favorável ao desenvolvimento de cianobactérias, as quais (ii) possuem uma melhor cinética de absorção do carbono inorgânico, sobretudo na forma de bicarbonato.

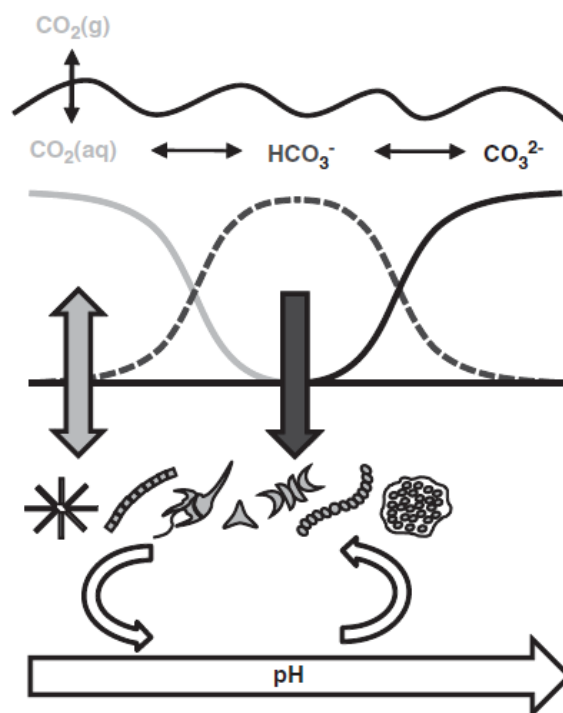


Figura 1. Diagrama conceitual das principais interações químicas e biológicas (microalgas) envolvendo a competição por carbono inorgânico na água (Van de Wall et al (2011))

Neste contexto, o *trade-off*² na utilização do carbono inorgânico por espécies fitoplanctônicas tem favorecido principalmente cianobactérias por estas possuírem traços funcionais que garantem eficiência na assimilação do CO₂, bem como na utilização do íon bicarbonato (HCO₃⁻) como fonte alternativa de carbono (LUCAS e BERRY 1985; SHAPIRO 1990), em razão do mecanismo de concentração de CO₂ (MCC) presente em cianobactérias, o qual é mediado pela anidrase carbônica e/ou transporte ativo (BADGER e PRICE 2003; GIORDANO, BEARDALL e RAVEN 2005). Estudos como os de Shapiro (1997) e Holland et al (2012) têm demonstrado que o CO₂ atua como um fator limitante do desempenho fotossintético em cianobactérias, com conseqüente déficit na aquisição de biomassa. No entanto, existem poucas evidências experimentais para a diferenciação interespecífica na dinâmica desses microrganismos com base em sua habilidade de explorar diferentes fontes de carbono.

Aspectos ecofisiológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii é uma cianobactéria diazotrófica de distribuição cosmopolita, ocorrente em diferentes latitudes. Esta espécie caracteriza-se por possuir

² Termo utilizado na Ecologia em um contexto evolutivo no qual uma espécie tem a flexibilidade de “tomar decisões” na utilização de um recurso em suas diferentes formas, ou de diferentes recursos.

tricomas que podem ser retos, sigmoides ou espiralados, com a presença de acinetos (esporo de resistência e reserva de energia; fósforo) e heterócitos (células fixadoras de N_2) terminais. Pode produzir neurotoxinas, como a saxitoxina e o BMAA (COX et al 2003), e citotoxinas (cilindrospermopsina), destacando-se entre as principais espécies dominantes em corpos d'água no Brasil (SOARES et al 2013). Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar os mecanismos fisiológicos associados à ampla distribuição e comportamento invasor desta espécie, como tolerância a elevadas temperaturas, promovidas pelas mudanças climáticas (PADISÁK 1997); radiação adaptativa subsequente ao último evento de glaciação (GUGGER et al 2005); plasticidade ecofisiológica a partir da existência de ecótipos adaptados a condições de diferentes regiões (PICCINI et al 2011), e/ou efeitos alelopáticos (FIGUEREDO, GIANI e BIRD 2007). A partir destas, estudos experimentais têm sido realizados para entender quais parâmetros ambientais que contribuem à predominância desta espécie nos corpos d'água, como luz (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al 2012), temperatura (SOARES, LÜRLING e HUSZAR 2013; YAMAMOTO e SHIAH 2014), nutrientes (WU, SHI e LI 2012), balanço cátion-aniônico, com ênfase no pH/ CO_2 (HOLLAND et al 2012), e alcalinidade/condutividade (CARNEIRO et al 2011; CARNEIRO, PACHECO e AZEVEDO 2013).

Apesar da ocorrência de florações estar tradicionalmente relacionada à eutrofização, devido à disponibilidade de nutrientes, observa-se também naquela condição um aumento no pH em consequência do metabolismo do nitrato (NO_3^-) com liberação de íons OH^- . Sob tais condições, o bicarbonato se torna uma das principais formas de carbono inorgânico, favorecendo, de acordo com Holland et al (2012), o crescimento de *C. raciborskii*, em razão de uma maior eficiência na cinética de assimilação deste íon como fonte de carbono.

Carneiro, Pacheco e Azevedo (2013) observaram diferenças fisiológicas de *C. raciborskii* relacionadas à dureza da água. Os autores identificaram respostas funcionais distintas conforme o complexo de carbonato utilizado (Ca, Mg e Na), sendo o melhor crescimento obtido na presença do magnésio. Tais vantagens podem ser discutidas em uma perspectiva evolutiva com base no modelo de Svanbäck e Bolnick (2005), o qual explica que populações podem adquirir especificidades quando há um *trade-off* no uso de fontes alternativas de um dado recurso, fornecendo, assim, subsídios para o entendimento dos mecanismos que favorecem a predominância de *C. raciborskii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTENUCCI, J.P., GHADOUANI, A., BURFORD, M.A., ROMERO, J.R. 2005. The long-term effect of artificial destratification on phytoplankton species composition in a subtropical reservoir. **Freshwater Biology**, 50: 1081 – 1093.

ASHLEY, K. I. **Effects of hypolimnetic aeration on functional components of the lake ecosystem**. Dissertação de Mestrado. The University of British Columbia. 1981.

AZOV, Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 43(6): 1300 – 1306.

BADGER, M.R., PRICE, G. D. P. 2003. CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, 54(383): 609 – 622.

BEUTEL, M.W. 2006. Inhibition of ammonia release from anoxic profundal sediments in lakes using hypolimnetic oxygenation. **Ecological Engineering**, 28: 271 – 279.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., BUCH, B., HEREMAN, T.C., ARRUDA-NETO, J.D.T., MOURA, A.N., ZOCCHI, S.S. 2012. Effects of light intensity and temperature on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) with straight and coiled trichomes: growth rate and morphology. **Brazilian Journal of Biology**, 72(2): 343 – 351.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A.N.; ARAGÃO-TAVARES, N.K.C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 86(1): 291 – 309.

BONILLA, S., AUBRIOT, L., SOARES, M.C.S., GONZÁLEZ-PIANA, M., FABRE, A., HUSZAR, V.L.M., LÜRLING, M., ANTONIADES, D., PADISÁK, J., KRU, C. 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **Fems Microbiology Ecology**, 79: 594 – 607.

BORICS, G., VÁRBÍRÓ, G., PADISÁK, J. 2013. Disturbance and stress: different meanings in ecological dynamics. **Hydrobiologia**, 711: 1 – 7.

BOUVY, M., FALCÃO, D., MARINHO, M., PAGANO, M., MOURA, A. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, 23: 13 – 27.

BOUVY, M.; NASCIMENTO, S. M.; MOLICA, R. J. R.; FERREIRA, A.; HUSZAR, V.; AZEVEDO, S. M. F. O. 2003. Limnological features in Tapacurá reservoir (Northeast, Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, 493: 115–130.

BROKES, J.D., CAREY, C.C. 2011. Resilience to blooms. **Science**, 334: 46.

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 change climate. **Water Research**, 46: 1394 – 1407.

CARNEIRO, R. L., ALÍPIO, A. C. N., BISCH, P. M., AZEVEDO, S. M. F. O., PACHECO, A. B. F. 2011. The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA) metabolism. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 1547 – 1559.

CARNEIRO, R. L., PACHECO, A. B. F., AZEVEDO, S. M. F. O. 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) correlate with water hardness. **Marine Drugs**, 11: 2949 – 2963.

CARRICK, H.J., ALDRIDGE, F.J., SCHELSKE, C.L. 1993. Wind influences phytoplankton biomass and composition in a shallow, productive lake. **Limnology and Oceanography**. 38: 1179 – 1192.

CONNELL, J., 1978. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. **Science**, 199: 1304–1310.

COSTA, M. V., NEUMANN-LEITÃO, S.; SANTOS, L. P. S. 2004. Bioindicadores da qualidade ambiental. *In*: Eskinazi-Leça, E.; Neumann-Leitão, S.; Costa, M. F. (Eds). **Oceanografia um cenário tropical**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Tecnologia e Geociências. p.319-352.

COWEL, B.C., DAWES, C.J., GARDINER, W.E., SCHEDA, S.M. 1987. The influence of whole lake aeration on the limnology of a hypereutrophic lake in central Florida. **Hydrobiologia**, 148: 3 – 24.

COX, P.A.; BANACK, S.A.; MURCH, S.J. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. **Proceedings of the National Academy of Science**, 100(23): 13.380 – 13.383.

DANTAS, E.W., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., MOURA, A.N. 2010. Spatial-temporal variation in coiled and straight morphotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria). **Acta Botanica Brasílica**, 24(2): 585 – 591.

DANTAS, E.W., MOURA, A.N., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. 2011. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 83(4): 1327 – 1338.

DEVERCELLI, M. 2006. Phytoplankton of the Middle Paraná River during an anomalous hydrological period: a morphological and functional approach. **Hydrobiologia**, 563: 465 – 478.

DITTMANN, E.; FEWER, D.P.; NEILAN, B.A. 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **Fems Microbiology Reviews**, 37: 23-43.

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

EKVALL, M.K.; MARTIN, J.D.C.; FAASSEN, E.J.; GUSTAFSSON, S.; LÜRLING, M.; HANSSON, L.A. 2013. Synergistic and species-specific effects of climate change and water colour on cyanobacterial toxicity and bloom formation. **Freshwater Biology**, 58: 2414 – 2422.

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.

GIORDANO, M., BEARDALL, J., RAVEN, J. A. 2005. CO₂ concentrating mechanism in algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. **Annual Review on Plant Biology**, 56: 99 – 131.

GUGGER, M., MOLICA, R., LE BERRE, B., DUFOUR, P., BERNARD, C., HUMBERT, J. F. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(2): 1097 – 1100.

HAYNES, R.C. 1973. Some ecological effects of artificial circulation on a small eutrophic lake with particular emphasis on phytoplankton. 1. Kezar Lake experiment, 1968. **Hydrobiologia**, 43: 463 – 504.

HENRY, R.; USHIMOHAMA, E.; FERREIRA, R. M. R. 2006. Fitoplâncton em três lagoas marginais ao Rio Paranapanema e em sua desembocadura no reservatório de Jurumirim (São Paulo, Brasil) durante um período prolongado de seca. **Revista Brasileira de Botânica**. 29:3, 399-414.

HOLLAND, D.P., PANTORNO, A., ORR, P.T., STOJKOVIC, S., BEARDALL, J. 2012. The impacts of a high CO₂ environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Water Research**. 46: 1430 – 1437.

HOLLAND, A.; KINNEAR, S. 2013. Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide? **Marine Drugs**, 11: 2239 – 2258.

HOPKINSON, B.M., DUPONT, C.L., ALLEN, A.E., MOREL, F.M.M. 2011. Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. **Proceedings of the National Academy of Science**, 108(10): 3830 – 3837.

Jl, Z.G. **Hydrodynamics and water quality: modeling rivers, lakes and estuaries**. John Wiley & Sons, 2008.

JUNGO, E., VISSER, P.M., STROOM, J., MUR, L.M. 2001. Artificial mixing to reduce growth of the blue-green alga *Microcystis* in lake Nieuwe Meer, Amsterdam: an evaluation of 7 years of experience. **Water science and technology**, 1(1): 17 – 23.

KING, D. L. 1970. The role of carbon in eutrophication. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, 42: 2035 – 2051.

KING, D. L. 1972. Carbon limitation in sewage lagoons. **Nutrients and Eutrophication**. ASLO Special Symposia, vol.1 (ed. G.E. Likens), pp. 98-110. Allen Press, Lawrence, Kansas.

KOKOCIŃŃSKI, 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(4): 365 – 374.

LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P.A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F.Q., OSHIMA, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, 37: 1359–1373.

LITCHMAN, E.; DE TEZANOS PINTO, P.; KLAUSMEIER, C. A.; THOMAS, M.K.; YOSHIYAMA, K. 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. **Hydrobiologia** 653: 15–28.

LUCAS, W. J., BERRY, J. A. (Eds.) **Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms**. American Society of Plant Physiologists. Waverly Press, Balimore. 1985.

MOURA, A.N.; DANTAS, E.W., OLIVEIRA, H.S.B., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. 2011. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. 71(2): 1 – 9.

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. **Journal of Ecology**, 61: 157 – 177.

MOWE, A.D.M., MITROVIC, S.M., LIM, R.P., FUREY, A., YEO, D.C.J. 2015. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. **Journal of Limnology**, 74(2): 205 – 224.

MUR, L.R.; SKULBERG, O.M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. *In*: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. E e FN Spon, London. 1999. 416p.

O'FARREL, I.; BORDET, F.; CHAPARRO, G. 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. **Hydrobiologia**, 698: 175 – 190.

PADISÁK, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archives fur Hydrobiology: Supplement**, 107: 563 – 593.

PASTOROK, R.A., LORENZEN, M.W., GINN, T.C. 1981. Artificial aeration and oxygenation of reservoirs: A review of theory, techniques and experiences. Tech. Rept. E-81 for U.S. Army Corps of Engineers.

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

REICHWALDT, E.S.; GHADOUANI, A. 2012. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. **Water Research**, 46: 1372 – 1393.

ROMO, S., SORIA, J., FERNÁNDEZ, F., OUAHID, Y., BARÓN-SOLÁ, A. 2013. Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria. **Freshwater Biology**, 58: 513 – 522.

SAKER, M.L., THOMAS, A.D., NORTON, J.H., 1999. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an Outback Region of North Queensland. **Environmental Toxicology**, 14: 179–182.

SHAPIRO, J. 1984. Blue-green dominance in lakes: the role and management significance of pH and CO₂. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, 69: 765 – 780.

SHAPIRO, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for importance of CO₂ and pH. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, 24: 38 – 54.

SHAPIRO, J. 1997. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. **Freshwater Biology**, 37: 307 – 323.

SMITH, V.H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae lake phytoplankton. **Science**. 221: 669 – 671.

SOARES, M.C.S., HUSZAR, V.L.M., MIRANDA, M.N., MELLO, M.M., ROLAND, F., LÜRLING, M. 2013. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, 717: 1 – 12.

SOARES, M.C.S., LÜRLING, M., HUSZAR, V.L.M. 2013. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Phycological Research**, 61: 61 – 67.

SOUZA-FILHO, F.A., MARTINS, E.S.P.R., PORTO, M. 2006. O processo de mistura em reservatórios do semi-árido e sua implicação na qualidade da água. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, 11(4): 109 – 119.

STITZ, L., KINNEAR, S., FABBRO, L. 2013. A role for aeration and intake depth in managing toxic *Cylindrospermopsis*: A comparison between off-stream and riverine environments in the Fitzroy Basin, Australia. **Lakes and Reservoirs: research and management**, 18: 179 – 196.

SVANBÄCK, R., BOLNICK, D. I. 2005. Intraspecific competition affects the strength of individual specialization: an optimal diet theory method. **Evolutionary Ecology Research**, 7: 993 – 1012.

TILMAN, D., KILHAM, S.S., KILHAM, P. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 13: 349 – 372.

TUNDISI, J.G. Gerenciamento integrado de Bacias Hidrográficas e Reservatórios – Estudos de Caso e Perspectivas. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. **Ecologia de Reservatórios. Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata**. São Carlos: RiMa, 2005, 472p.

VAN DE WAAL, D. B., VERSPAGEN, J. M. H., FINKE, J. F., VOURNAZOU, V., IMMERS, A. K., KARDINAAL, W. E. A., TONK, L., BECKER, S., VAN DONK, E., VISSER, P. M., HUISMAN, J. 2011. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO₂. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, 5: 1438 – 1450.

YAMAMOTO, Y., SHIAH, F.K. Growth trichome size and akinete production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) under different temperatures: Comparison of two strains isolated from the same pond. **Phycological Research**, 62: 147 – 152.

WHITTON, B., POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2000.

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.

ZEVENBOOM, W. 1987. Ecophysiology of nutrient uptake, photosynthesis and Growth. **Can. Bull. Fish. Aquatic. Sci.**, v. 214, pp. 391-422.

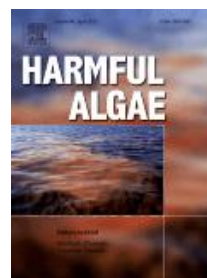
ARTIGO

**EFEITOS DO BALANÇO pH/CARBONO INORGÂNICO NO CRESCIMENTO
DE *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA): *INSIGHTS* PARA SUA
DOMINÂNCIA EM LAGOS TROPICAIS**

O trabalho será submetido à revista **Harmful Algae**

Qualis CAPES: A1

Fator de impacto (JCR): 3.874



**Efeitos do balanço pH/carbono inorgânico no crescimento de
Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria): *insights* para sua
dominância em lagos tropicais**

M. C. P. VILAR¹, A. N. MOURA², R. J. R. MOLICA³

1 – Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900. Recife – PE, Brasil. E-mail: maurovilar@gmail.com

2 – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900. Recife – PE, Brasil. E-mail: ariadne@db.ufrpe.br

3 – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, CEP: 55292-270. Garanhuns – PE, Brasil. E-mail: rmolica@uag.ufrpe.br*

*Autor para correspondência.

Resumo: A eutrofização dos corpos d'água, associada a elevadas concentrações de N e P, tem sido indicada como principal promotor de florações de cianobactérias. Entretanto, pouco tem se investigado sobre a influência do balanço pH/carbono inorgânico no crescimento desses microorganismos. Dentre as espécies potencialmente tóxicas, destaca-se *Cylindrospermopsis raciborskii*, uma espécie fixadora de N₂, considerada invasora em diferentes latitudes, a qual tem apresentado forte afinidade à condição de pH alcalino e baixa concentração de CO₂ observados na natureza em ambos períodos de mistura, bem como estabilidade dos corpos d'água. Assim, o presente trabalho objetivou investigar o efeito de diferentes faixas de pH, associadas à disponibilidade de carbono inorgânico, em parâmetros relacionados ao crescimento de *C. raciborskii*. A cepa ITEP-A1 foi cultivada em meio de cultura ASM-1 e mantida sob condições controladas. O delineamento experimental consistiu do cultivo da linhagem ITEP-A1 em diferentes condições de pH com e sem aeração. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers com 1,5 L de meio de cultura e foram analisados a taxa de crescimento, traços morfológicos e aquisição de biomassa em *C. raciborskii* e as variáveis temperatura, pH, condutividade, alcalinidade e carbono inorgânico total dissolvido no meio. Análises estatísticas dos dados foram executadas nos programas Statística 7.0 e R i386 3.1.2. *C. raciborskii* ITEP-A1 apresentou maior taxa de crescimento e biomassa em pH alcalino (>8,0) e com aeração. Sob pH > 8,0 e, associado à constante entrada de CO₂, promovida pela aeração do meio, o íon bicarbonato (HCO₃⁻) foi a principal fonte de carbono inorgânico disponível ao processo fotossintético, o que favoreceu o crescimento de *C. raciborskii*. Dessa forma, o balanço pH/CO₂ pode ser sugerido como um dos fatores que tem favorecido a expansão dessa cianobactéria em ecossistemas aquáticos de diferentes latitudes.

Palavra-chave: cianobactéria, MCC, crescimento.

1. Introdução

Estudos que avaliam o desempenho de espécies de cianobactérias e microalgas sob limitação de nutrientes têm mostrado que esses organismos dispõem de estratégias ecofisiológicas para suportar tais condições de estresse, como produção de células especializadas para fixação e estocagem de P e N, mixotrofia e redução da taxa metabólica, com diminuição do consumo energético (Whiton & Potts, 2000). Em regiões tropicais e subtropicais, a deficiência de N tem sido apontada como uma das principais causas da dominância de cianobactérias fixadoras do nitrogênio (Lewis, 1996). No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento dessas espécies, em relação à limitação do crescimento associada ao pH e à afinidade com diferentes fontes de carbono inorgânico, em condições de abundância de demais nutrientes.

Investigações sobre a influência da relação pH/carbono inorgânico no crescimento e dominância de cianobactérias em lagos foram iniciados a partir das observações de King (1970), o qual descreveu mudanças na comunidade algal em função do CO₂ e pH. O autor relata que em pH alcalino, as cianobactérias, geralmente, são os organismos dominantes na comunidade fitoplanctônica. Entretanto, quando esse decresce, com acentuado aumento do CO₂, diatomáceas e clorofíceas tornam-se mais abundantes. Tal hipótese foi comprovada em experimentos em campo e laboratório por Shapiro (1984; 1990; 1997). Além disso, dados de experimentos anteriores com *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* já evidenciavam a preferência de algas verdes por um pH mais neutro (~7,5) associado a elevadas concentrações de CO₂ livre (Azov, 1983).

Mecanismos de dominância de cianobactérias nos corpos d'água geralmente envolvem o rápido aumento de biomassa em resposta à elevada disponibilidade de nutrientes na coluna d'água. Nesses ambientes o pH não apenas está relacionado com a fonte de carbono inorgânico disponível, mas também com a disponibilidade de nutrientes assimiláveis pelos produtores. Em experimentos com amostras de sedimento do rio Sassafra (Maryland, EUA), Gao et al. (2012) verificaram sob pH alcalino um aumento no efluxo de NH₃ (amônia dissolvida), a partir da conversão do NH₄⁺, o que geralmente ocorre

em sob anoxia do hipolimnio. Em contrapartida, na presença de oxigênio, parte do NH_4^+ pode sofrer oxidação, gerando outras formas de nitrogênio inorgânico ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) (Cornwell et al., 1999). Assim, apesar de algumas espécies de cianobactérias serem capazes de fixar N_2 , tais microrganismos preferem assimilar outras formas do nitrogênio, alocando energia da fixação biológica em outras atividades metabólicas (Paerl, 2008).

Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales) é uma espécie de cianobactéria invasora cuja ocorrência foi inicialmente registrada para regiões tropicais (Padisák, 1997), apresentando, atualmente, o registro de ecótipos também em zonas temperadas (Piccini et al. 2011). Além da capacidade invasora, esta espécie tem obtido atenção da comunidade científica por ser potencialmente produtora de cilindrospermopsina (peptídeos citotóxicos) e saxitoxinas (alcaloides neurotóxicos) (Dittmann et al., 2013). Florações dessa espécie têm sido registradas em lagos eutróficos, sendo principalmente associadas à discreta variação de temperatura e disponibilidade de luz comumente verificados em baixas latitudes (Dantas, Bittencourt-Oliveira & Moura, 2010; Soares et al., 2013). Além disto, a persistência e dominância dessa espécie também tem mostrado forte relação com a disponibilidade dos nutrientes P e N, como fósforo dissolvido total (Moura et al., 2011; Soares et al. 2013) e NH_4^+ (Kokocinski et al., 2010). No entanto, pouco tem se verificado da resposta de *C. raciborskii* em função do balanço entre o pH e CO_2 .

Diversos processos naturais contribuem com a emissão de CO_2 na atmosfera, no entanto, a interferência antrópica tem sido apontada como preponderante, através de atividades como a queima de combustível fóssil, desmatamento e industrialização. Registros da literatura apontam que na era pré-industrial as concentrações de dióxido de carbono na atmosfera era de 272 ppm e passaram para 346 ppm a partir da década de 80 (Hall, 1989). Assim, até o final do século XXI espera-se que a concentração de CO_2 atmosférico esteja três vezes maior, em relação às condições atuais (Holland et al., 2012). Tal condição tende a interferir na dinâmica do pH/carbono inorgânico, promovendo uma arena competitiva entre espécies fitoplanctônicas com diferentes mecanismos de concentração de carbono, o que pode favorecer o estabelecimento de cianobactérias (Shapiro, 1997).

Assim, para preencher essa lacuna do conhecimento, no presente trabalho foram investigadas as respostas de *C. raciborskii* a diferenças no pH e efeito da aeração, no contexto do balanço do CO₂, através de parâmetros do crescimento e aquisição de biomassa. As hipóteses testadas neste estudo subsidiam o entendimento da atividade do MCC (mecanismo de concentração de carbono) sob diferentes formas do carbono inorgânico dissociado na água. Dessa forma, assumiu-se que em *C. raciborskii* tal mecanismo é estimulado sob pH alcalino e disponibilidade de bicarbonato.

2. Material e Métodos

2.1 Condições de cultivo e delineamento experimental

A cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP-A1 (produtora de saxitoxinas) utilizada neste estudo, foi isolada do reservatório de Arcoverde (PE, Brasil). Todos os cultivos foram feitos em erlenmeyers de 2 L com 1,5 L de meio ASM-1 (Gorham et al., 1964) sob 25 °C ± 1 °C, ~ 80 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo 12h. O delineamento experimental consistiu de culturas fechadas (*batch*) não-axênicas com e sem aeração sob pH livre, 6,8 e 8,2, sendo os dois últimos mantidos com tampão HEPES Sigma-Aldrich® a 20,14 mM o qual evitará a ocorrência de variação ao longo do cultivo. Os tratamentos foram estabelecidos em triplicata.

2.2 Avaliação de crescimento e aquisição de biomassa

Foram retiradas alíquotas do cultivo a cada dois dias, a partir do inóculo inicial, as quais foram preservadas com solução de lugol acético 1% para posterior análise quantitativa e traços morfológicos. A estimativa da densidade populacional foi realizada através de contagens em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico, segundo Guillard (1973) e as curvas de crescimento foram expressas em células mL⁻¹. Além disso, dimensões (comprimento e diâmetro) dos tricomas (n=30) e células (n=30) foram analisadas em microscópio ZEISS Scope A1 com câmera AxioCam ERc5s acoplada (Software Axiovision Release 4.8.2 06-2010), para verificar a variação de traços morfológicos como dimensão linear máxima (DLM) e razão área-volume (S/V).

A taxa de crescimento foi calculada durante a fase exponencial de acordo com Fogg & Thake (1987) conforme a equação:

$$\mu = \frac{(\ln N_2 - \ln N_1)}{(t_2 - t_1)}$$

em que, N_2 =densidade final; N_1 =densidade inicial; T_2 =tempo final (dia); T_1 =tempo inicial (dia). O intervalo escolhido foi a maior faixa na qual o R^2 da curva se manteve acima de 0,95.

O rendimento foi calculado através do rendimento celular final (R_1) e inicial (R_0), como $R=R_1/R_0$, e o tempo de duplicação (G dia⁻¹) a partir da taxa de crescimento (μ), como:

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Para avaliar a aquisição de biomassa, os valores de densidade celular foram convertidos em biovolume ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$) (Hillebrand et al., 1998; Sun & Liu, 2003) e a quota de carbono/célula foi estimada usando a fórmula de conversão ($C = aV^b$, em que $a=0,1204$; $b=1,051$; V =volume da célula) (Rocha & Duncan, 1985), sendo expresso em pg.C célula^{-1} . A biomassa nos diferentes tratamentos foi estimada a partir do biovolume, assumindo a densidade dos organismos igual à da água ($1\text{mm}^3 \text{L}^{-1} = 1 \text{mg L}^{-1} = 1000 \mu\text{g L}^{-1}$) e utilizando a equação: $C = B \times 0,22$ em que, C = Carbono no fitoplâncton ($\mu\text{g C L}^{-1}$); B = Biomassa ($\mu\text{g L}^{-1}$) e $0,22$ = Constante (para cianobactéria) (Wetzel & Likens, 2000).

2.3 Co-variáveis físico-químicas (Temperatura, Alcalinidade, pH e Condutividade)

Alcalinidade e pH foram utilizados como parâmetros para avaliar a dinâmica do carbono inorgânico ($p\text{CO}_2$ (H_2CO_3) \rightarrow HCO_3^- \rightarrow CO_3^{2-}) e consequente balanço cátion-aniônico. A alcalinidade foi mensurada usando o método volumétrico potenciométrico de Gran (1952) adaptado de Talling (1973), para determinação da alcalinidade total, a partir da adição de diferentes volumes de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.1N para reduzir o pH do meio em uma alíquota de 10 mL para uma faixa entre 3,7 – 4,0. O pH foi avaliado em pHmetro (Marconi modelo PA 200). A condutividade e temperatura foram mensuradas em

condutivímetro (Lutron, Modelo CD-4303), e expressa em mS cm^{-1} e $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

2.4 Estimativa do carbono inorgânico dissolvido

O Ci (carbono inorgânico dissolvido) foi estimado a partir da mensuração da alcalinidade e do pH (Wetzel & Likens, 2000) como:

$\text{Ci} = (\text{alcalinidade total}) \times (\text{fator de pH tabelado})$, sendo os valores expressos em mg Ci L^{-1} .

2.5 Análise estatística

ANOVA fatorial com medidas repetidas foi usada para avaliar a variação no crescimento. Diferenças na taxa específica de crescimento, biomassa e traços morfológicos foram avaliadas através da ANOVA *one way* com o Teste de Tukey *a posteriori* em que foram avaliados os efeitos de ambos os blocos pH e aeração, bem como a interação entre estes. Para todos os testes adotou-se o nível $P < 0,05$ de significância. As análises estatísticas foram executadas nos programas Statistica 7.0 e R i386 3.1.2, respectivamente.

3. Resultados e discussão

Crescimento de Cylindrospermopsis raciborskii

O crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP-A1 foi fortemente influenciado quando cultivado sob diferentes faixas de pH do meio ($F_{(14,84)}=3,67$; $P<0,01$) e aeração ($F_{(7,84)}=29,67$; $P<0,01$), a qual por sua vez estimulou um rendimento em densidade $\geq 10^7$ células mL^{-1} (**Figura 1**).

Uma maior taxa de crescimento ($F_{(5,12)}= 4,23$; $P<0,05$) pôde ser registrada sob pH 8,2 (com aeração) (Tukey, $P<0,05$) (**Figura 2**). De forma geral, cultivos sob pH mais alcalino (pH 8,2 com/sem aeração e livre com aeração) apresentaram as maiores taxas de crescimento. Paralelamente, em tais condições experimentais, *C. raciborskii* também apresentou um elevado rendimento celular ($\geq 10^7$, 10^6 e 10^7 células mL^{-1}) e menor tempo de duplicação ($0,79\pm 0,17$, $0,89\pm 0,06$ e $0,90\pm 0,12$ dia^{-1}), respectivamente.

Considerando a constante de dissociação do CO₂ na água, em uma faixa de pH 7,0 – 9,0, o íon HCO₃⁻ é a fonte de carbono inorgânico predominante e disponível para incorporação no processo fotossintético. Autores como Holland et al. (2012) têm evidenciado uma maior eficiência do crescimento e mecanismo de concentração de CO₂ (MCC) em *C. raciborskii*, a qual obtém maior parte do seu carbono do íon bicarbonato, via anidrase carbônica. Esse mecanismo inicia-se no espaço extracelular onde a α-anidrase carbônica converte o CO₂ em HCO₃⁻ (ou vice-versa) o qual por sua vez é ativamente capturado por transportadores de bicarbonato (Giordano et al., 2005). Subsequentemente, o dióxido de carbono se difunde livremente através da membrana plasmática, num processo em que a concentração interna de bicarbonato pode ser elevada em até três ordens de magnitude em relação à concentração extracelular desse íon, o qual se difunde para os carboxissomas onde é convertido de volta a dióxido de carbono na presença da RuBisCO, e em seguida, completamente assimilado através da via redutora da pentose fosfato (Badger & Price, 2003).

Em contrapartida, sob pH 6,8 com/sem aeração foram registradas as menores taxas de crescimento e maior tempo de duplicação (0,98±0,27 e 1,56±0,29 dia⁻¹) (**Figura 2**). Além disso, apesar da análise dos dados não ter identificado interações significativas entre os blocos pH e aeração ($P>0,05$) (**Tabela 1**), a avaliação separada desses permitiu compreender o papel realizado por cada um no desempenho da cianobactéria, de forma que sob pH mais ácido, *C. raciborskii* apresentou um maior investimento em estocagem de carbono e estrutura celular, explicados por um aumento na cota de carbono celular e traços morfológicos (**Tabela 2**) (**Figura 3**).

Tal comportamento pode evidenciar o ajuste fisiológico de *C. raciborskii* para um maior investimento na aquisição de energia com alocação do carbono na síntese de moléculas de reserva (carboidratos), em oposto à duplicação celular. Esses resultados são consistentes com as observações de Stöckel et al. (2013), os quais avaliaram a influência da disponibilidade de carbono na morfologia e processos metabólicos de *Cyanothece* 51142, em que registraram um aumento no volume celular e número de grânulos de glicogênio da cianobactéria, relacionados à condição de elevada concentração de CO₂ do

meio. Além disso, os autores ressaltam que tais condições estimulam a transcrição de genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos e peptidoglicano, resultando em um incremento nas dimensões celulares. Sob condições similares Pierangelini et al. (2014) também reportaram um aumento (30%) no volume celular médio em células de *C. raciborskii*.

A diminuição do pH também pode causar diferentes efeitos a nível molecular, sobretudo no que diz respeito às funções de membrana, bem como na estabilidade de substâncias sintetizadas pela célula. Em experimentos com *C. raciborskii* em diferentes faixas de pH (3.0 – 7.0), Qian et al. (2014) verificaram uma relação negativa entre a liberação de saxitoxina e cilindrospermopsina, e o pH. Os autores relataram que o estresse causado pelo balanço cátion-aniônico pode interferir na permeabilidade celular, bem como no funcionamento de muitas proteínas transportadoras associadas à membrana, devido à perda e/ou ganho de prótons pelos aminoácidos, como mecanismo de estabilização do pH do meio.

A aeração promoveu um rápido crescimento, com conseqüente aumento no rendimento em biomassa, o que resultou em valores de duas (pH livre e 6,8) e sete vezes (pH 8,2) maiores do que os tratamentos sem aeração (**Tabela 2**) (**Figura 4**). Tais resultados evidenciam uma condição “ótima” de cultivo, em que o pH alcalino associado à entrada de CO₂ via aeração promoveram a conversão dessa fonte de carbono inorgânico no íon bicarbonato, o qual estimulou o crescimento de *C. raciborskii*.

O bicarbonato desempenha um importante papel fisiológico na fotossíntese, promovendo trocas iônicas, constituindo um requerimento essencial para o transporte de elétrons no fotossistema II, mais especificamente, no sítio de atividade de proteínas plastoquinonas (Blugough & Govindjee, 1988). Além disso, a disponibilidade de carbono inorgânico pode promover efeitos em nível de expressão gênica, integrando mecanismos da resposta fotossintética, como registrado por Burnap et al. (2013) em experimentos para investigar a regulação do mecanismo de concentração de carbono em *Synechocystis* sp. PCC6803.

Price et al. (2008) afirmam que o bicarbonato é uma forma iônica de carbono inorgânico ideal para o armazenado intracelular, em virtude de sua elevada impermeabilidade à membrana lipídica, especialmente sob uma faixa de pH citoplasmático de 7,8–8,2. Neste estudo, na faixa de “pH ótimo” (> 8,0) para o crescimento de *C. raciborskii*, apesar de ocorrência de células menores, uma maior taxa de duplicação celular observada pode ter exercido um “efeito compensatório” no comprimento dos tricomas, explicando a ocorrência dimensões lineares semelhantes entre esses tratamentos.

Variáveis correlatas ao balanço pH/CO₂

Observou-se diferenças significativas no pH ($F_{(7,28)}= 9,79$, $P<0,01$), alcalinidade ($F_{(7,28)}= 33,56$; $P<0,01$) e carbono inorgânico ($F_{(7,28)}= 33,56$; $P<0,01$), ao longo do experimento, entre os cultivos pH livre, com e sem aeração, com os respectivos valores mínimos e máximos: pH (6,8 – 11,3 e 7,3 – 9,8), carbono inorgânico (1,4 – 16,8 e 1,4 – 5,6 mg Ci L⁻¹) e alcalinidade (5,8 – 70 e 6,2 – 23,3 mg L⁻¹), sendo os maiores valores obtidos sob condições de aeração (**Figura 5**). Tais variáveis (pH e alcalinidade) foram avaliadas apenas no tratamento pH livre, uma vez que nos demais tratamentos o pH foi constante e variações não foram esperadas em função do tamponamento do meio.

Nas mesmas condições, temperatura ($24,7\pm 0,71$ e $24,9\pm 0,58$ °C) e condutividade elétrica ($424\pm 0,1$ e $402\pm 0,2$ μS cm⁻¹) mantiveram-se homogêneas ao longo dos cultivos.

A **figura 5** representa as variações significativas do balanço pH/carbono inorgânico dissolvido, no qual foi possível observar uma acentuada elevação do pH, com amplitude de variação de 6,8 a ~12,0, sobretudo sob condições de aeração, o que pode ser explicado pela dissociação do CO₂ em HCO₃⁻ promovendo uma gradual alcalinização do meio. Além disso, apesar de inicialmente ambas as condições apresentarem valores similares de pH/carbono inorgânico, a partir do 10º dia do cultivo (**Figura 5**) aerado observou-se um aumento dessas variáveis, coincidindo com a fase de desaceleração do crescimento da cianobactéria. Isso pode ser explicado pela elevada concentração de carbonato proveniente da dissociação do CO₂ no meio sob pH > 9,5, associada à ausência de mecanismos fisiológicos, bem

como transportadores de membrana para a utilização dessa fonte de carbono inorgânico em *C. raciborskii*.

Entretanto, existem espécies adaptadas à utilização do carbonato, consideradas extremas alcalihalofílicas, como *Euhalothece* sp. Esses microrganismos apresentam mecanismos fisiológicos que permitem a utilização do CO_3^{2-} para obtenção do CO_2 (Mikhodyuk et al. 2008; Chi et al. 2013). Cianobactérias desse grupo comumente ocorrem em lagos alcalinos os quais são geralmente formados em relevos cársticos, onde a erosão de rochas calcáreas resulta na dissolução de diferentes sais carbonatos para o corpo d'água, promovendo elevados valores de pH, associados ao efeito de tamponamento do meio.

Em lagos e reservatórios, variações no pH podem ocorrer ao longo de um ciclo nictemeral, sendo mediadas principalmente em função do balanço entre a fotossíntese e a respiração celular no corpo d'água. Além disso, o pH pode aumentar gradativamente, acompanhado da depleção do CO_2 , em ciclos sazonais onde registra-se períodos de dominância de cianobactérias. Van der Waal et al. (2011) afirmam que em tais condições observa-se um acentuado aumento na disponibilidade do íon bicarbonato na coluna d'água.

Além de influenciar na constante de especiação do carbono inorgânico na água, outros processos do ambiente também podem ser mediados pelo pH. Gao et al. (2012) constataram que, no ambiente, a elevação do pH aumenta o suprimento de nitrogênio inorgânico assimilável pelo fitoplâncton, proveniente do sedimento. No presente estudo, ambos os tratamentos foram supridos com concentrações semelhantes de nutrientes, a fim de descartar qualquer interferência nutricional na cianobactéria, e assumindo apenas o efeitos causados pela variação no pH, bem como na condição de borbulhamento de ar no meio. No entanto, diversos processos do metabolismo biológico podem interferir no pH do meio, como mecanismos de troca e hidrólise catiônica, assim como oxidação biológica (Wetzel, 2001).

No presente estudo, além da adição de CO_2 , a aeração favoreceu a mistura do meio. Tal condição permitiu que *C. raciborskii* ampliasse a superfície de contato com os nutrientes, bem como com a luz, otimizando assim o

crescimento. Outras espécies formadoras de florações, como *Microcystis aeruginosa*, também têm apresentado melhor desempenho sob aeração. Qiu & Gao (2002) verificaram um aumento da aquisição de carbono inorgânico, bem como na taxa de crescimento dessa cianobactéria, quando cultivada sob borbulhamento de ar.

No ambiente, parte do carbono inorgânico presente na água é proveniente do metabolismo aquático. De acordo com Wetzel (2001), o CO₂ produzido na zona trofólitica (respiração) dos lagos pode acumular em grandes quantidades no hipolímnio, podendo ser disponibilizado na coluna d'água dependendo do regime de mistura, morfometria e profundidade da bacia hidrográfica. Entretanto, devido à demanda global de CO₂ atmosférico, a difusão desse via interface ar-água tem influenciado na dinâmica do carbono inorgânico, alcançando valores > 400 ppm (NOAA, 2015), o que equivale a aproximadamente 18 µmol CO₂/L difundido na água. Esse, por sua vez, aliado ao avançado estado de eutrofização observado na maioria dos corpos d'água, comumente associados a um pH alcalino (> 8,0), favorece a predominância do íon HCO₃⁻ como principal fonte de carbono inorgânico. Este fenômeno tem sido sugerido por Verspagen et al. (2014) como intensificador de florações de cianobactérias. Neste contexto, a tendência atual de aumento no CO₂ atmosférico, associada à alcalinização dos corpos d'água e disponibilidade do bicarbonato, poderá promover a exclusão competitiva e favorecer a dominância de espécies fisiologicamente adaptadas a tal condição ambiental.

5. Conclusões

Os resultados sugerem que o mecanismo de concentração de carbono em *C. raciborskii* foi estimulado pelo pH elevado associado à disponibilidade do íon bicarbonato, o qual foi potencializado pela aeração do meio. Tais *insights*, aliados à plasticidade fenotípica de *C. raciborskii*, a qual permite o ajuste dessa cianobactéria a luz, nutrientes e temperatura, podem explicar a sua ocorrência e predominância em lagos distribuídos em diferentes latitudes; sobretudo nos trópicos onde verifica-se uma constância dessas variáveis, em comparação com as regiões temperadas.

6. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão de bolsa e à Central de Laboratórios (CENLAG/UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns pela estrutura física para execução do experimento.

7. Referências Bibliográficas

Azov, Y. 1982. Effect of pH on Inorganic Carbon Uptake in Algal Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 43(6): 1300 – 1306.

Badger, M.R., Price, G.D. 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, 54, 609–622.

Blubaugh, D. J., Govindjee. 1988. The molecular mechanism of the bicarbonate effect at the plastoquinone reductase site of photosynthesis. **Photosynthesis Research**, 19: 85 – 128.

Burnap, R. L., Nambudiri, R., Holland, S. 2013. Regulation of the carbon-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in response to changing light intensity and inorganic carbon availability. **Photosynthesis Research**, 118: 115 – 124.

Chi, Z., Xie, Y., Elloy, F., Zheng, Y., Hu, Y., Chen, S. 2013. Bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system with alkalihalophilic cyanobacterium. **Bioresource Technology**, 133: 513 – 521.

Cornwell, J. C., Kemp, W. M., And Kana, T. M. 1999. Denitrification in coastal ecosystems: methods, environmental controls and ecosystem level controls, a review, **Aquat. Ecol.**, 33, 41–54.

Dantas, E.W., Bittencourt-Oliveira, M.C., Moura, A.N. 2010. Spatial-temporal variation in coiled and straight morphotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolsz) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria). **Acta Botanica Brasilica**, 24(2): 585 – 591.

Dittmann, E.; Fewer, D.P.; Neilan, B.A. 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **Fems Microbiology Reviews**, 37: 23-43.

Fogg, G. E., Thake, B. **Algae cultures and phytoplankton ecology**. The University of Wisconsin Press, Ltd., London. Third Ed. 269p, 1987.

Gao, Y., Cornwell, J.C., Stoecker, D.K., Owens, M.S. 2012. Effects of cyanobacteria-driven pH increase on sediment nutrient fluxes and coupled nitrification-denitrification in a shallow fresh water estuary. **Biogeosciences**, 9: 2697 – 2710.

Giordano, M., Beardall, J., Raven, J.A. 2005. CO₂ 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.

Gran, G., 1952. Determination of the equivalent point in potentiometric titrations. **Part II Analyst** 77: 661–671.

Guillard, R. R. L. Division rates. In: Stein. J. (ED). (1973). **Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 289-311.

Hall, D.O. 1989. Carbon flows in the biosphere: present and future. **Journal of The Geological Society**, 146: 175 – 181.

Hillebrand, H., Dürselen, C., 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 CO₂ environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Water Research**. 46: 1430 – 1437.

King, D. L. 1970. The role of carbon in eutrophication. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, 42: 2035 – 2051.

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(4): 365 – 374.

Lewis, W. M. J. 1996. Tropical lakes: how latitude makes a difference. *In*: Schiemer, F., Boland, K.T. (Eds.), **Perspectives in Tropical Limnology**, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp. 43-64.

Mikhodyuk, O. S., Zavarzin, G. A., Ivanovsky, R. N. 2008. Transport systems for carbonate in the extremely natronophilic cyanobacterium *Eubalthece* sp. **Microbiology**, 77(4): 412 – 418.

Moura, A.N.; Dantas, E.W., Oliveira, H.S.B., Bittencourt-Oliveira, M. C. 2011. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. 71(2): 1 – 9.

National Oceanic and Atmospheric Administration – Earth System Research Laboratory. Global Greenhouse Gas Reference Network / Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>), 2015.

Paerl, H.: Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. 2008. *in*: Hudnell, K. (Ed.), **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, Springer, North Carolina, USA, pp.217–237.

Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Arch. Hydrobiol.** 107, 563–593.

Pierangelini, M., Stojkovic, S., Orr, P.T., Beardall, J. 2014. Elevated CO₂ causes changes in the photosynthetic apparatus of a toxic cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of Plant Physiology**, 171: 1091 – 1098.

49

Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful algae**, 10: 644 – 653.

Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., Long, B.M. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. **Journal of Experimental Botany**, 59(7): 1441 – 1461.

Qian, F., Dixon, D.R., Newcombe, G., Ho, L., Dreyfus, J., Scales, P.J. 2014. The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes. 2014. **Harmful algae**, 39: 253 – 258.

Qiu, B., Gao, K. 2002. Effects of CO₂ 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.

Rocha, O., Duncan, A. 1985. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplankton studies. **Journal of Plankton Research**, 7(2): 279 – 294.

Shapiro, J. 1984. Blue-green dominance in lakes: the role and management significance of pH and CO₂. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, 69: 765 – 780.

Shapiro, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for importance of CO₂ and pH. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, 24: 38 – 54.

Shapiro, J. 1997. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. **Freshwater Biology**, 37: 307 – 323.

Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Miranda, M.N., Mello, M.M., Roland, F., Lüring, M. 2013. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, 717: 1 – 12.

Stöckel, J., Elvitigala, T.R., Liberton, M., Pakrasi, H. B. 2013. Carbon availability affects diurnally controlled processes and cell morphology of *Cyanothece* 51142. **Plos One**, 8(2): e56887

Sun, J., Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**. 25(2): 1331 – 1346.

Talling, J.F. 1973. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters. **Freshwater Biology**. 3 (4): 335 – 362.

Van De Waal, D. B., Verspagen, J. M. H., Finke, J. F., Vournazou, V., Immers, A. K., Kardinaal, W. E. A., Tonk, L., Becker, S., Van Donk, E., Visser, P. M., Huisman, J. 2011. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO₂. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, 5: 1438 – 1450.

Verspagen, J. M.H., Van de Waal, D.B., Finke, J.F., Visser, P.M., Donk, E.V., Huisman, J. 2014. Rising CO₂ levels will intensify phytoplankton blooms in eutrophic and hypertrophic lakes. **Plos One**, 9(8): e104325.

51

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.

Whitton, B., Potts, M. **The ecology of cyanobacteria**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2000.

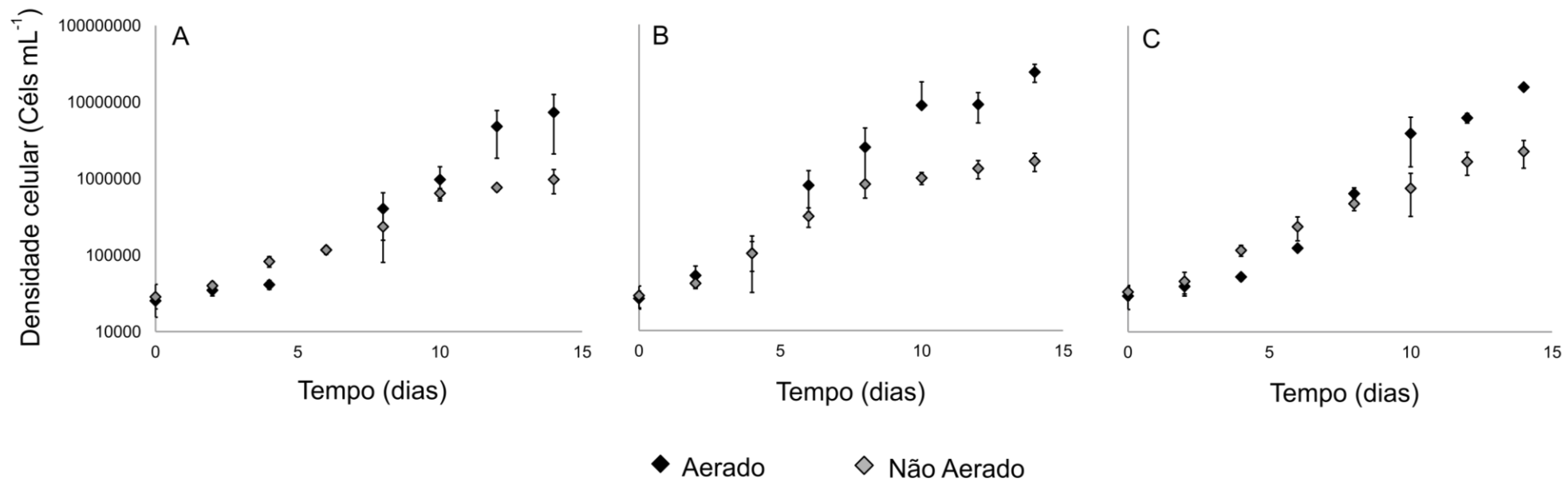


Figura 1.

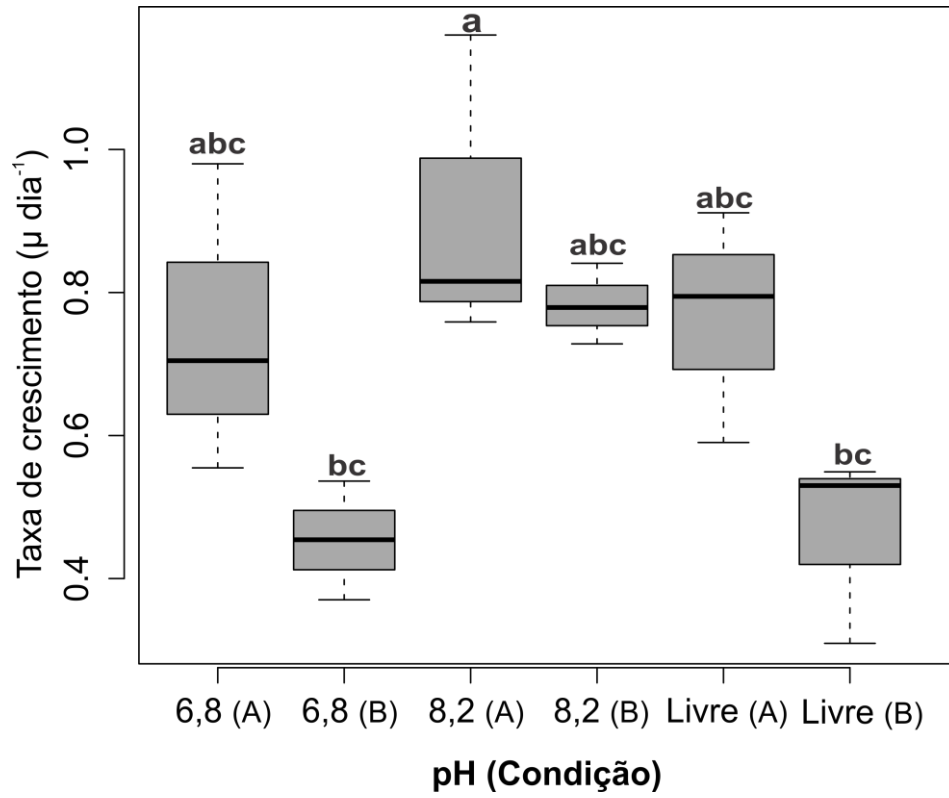


Figura 2.

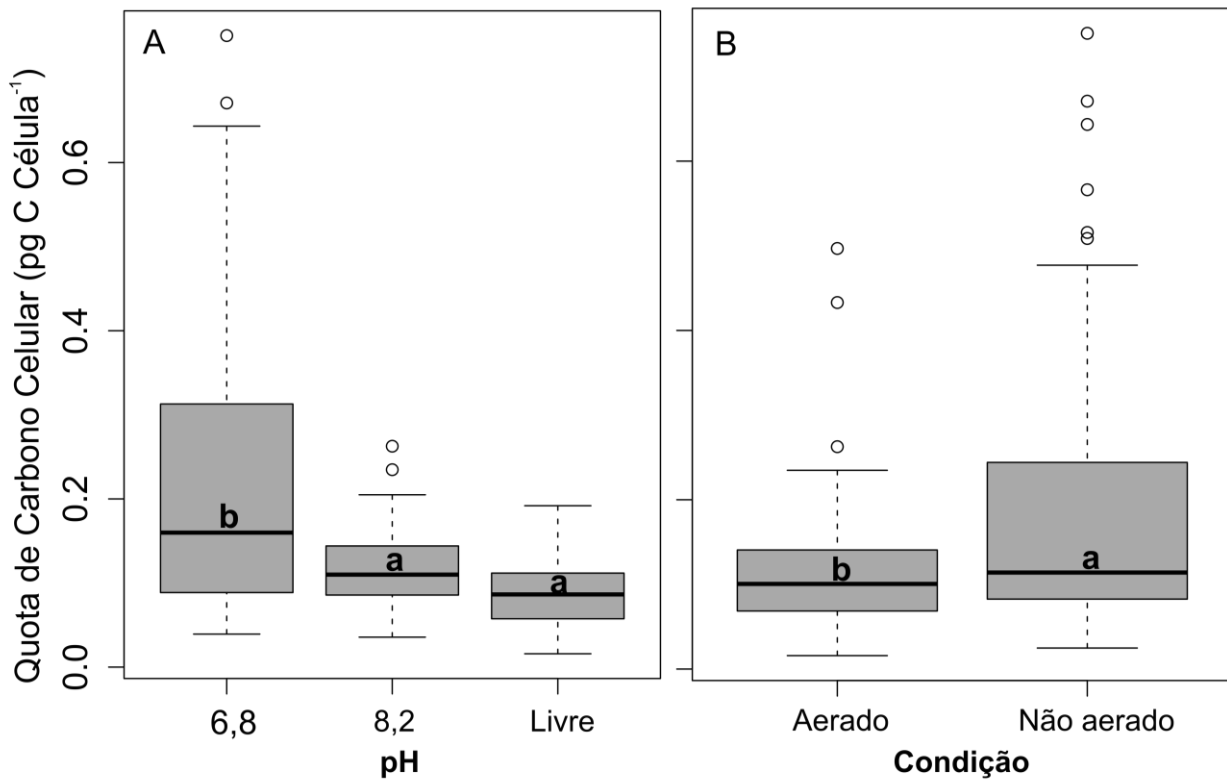


Figura 3.

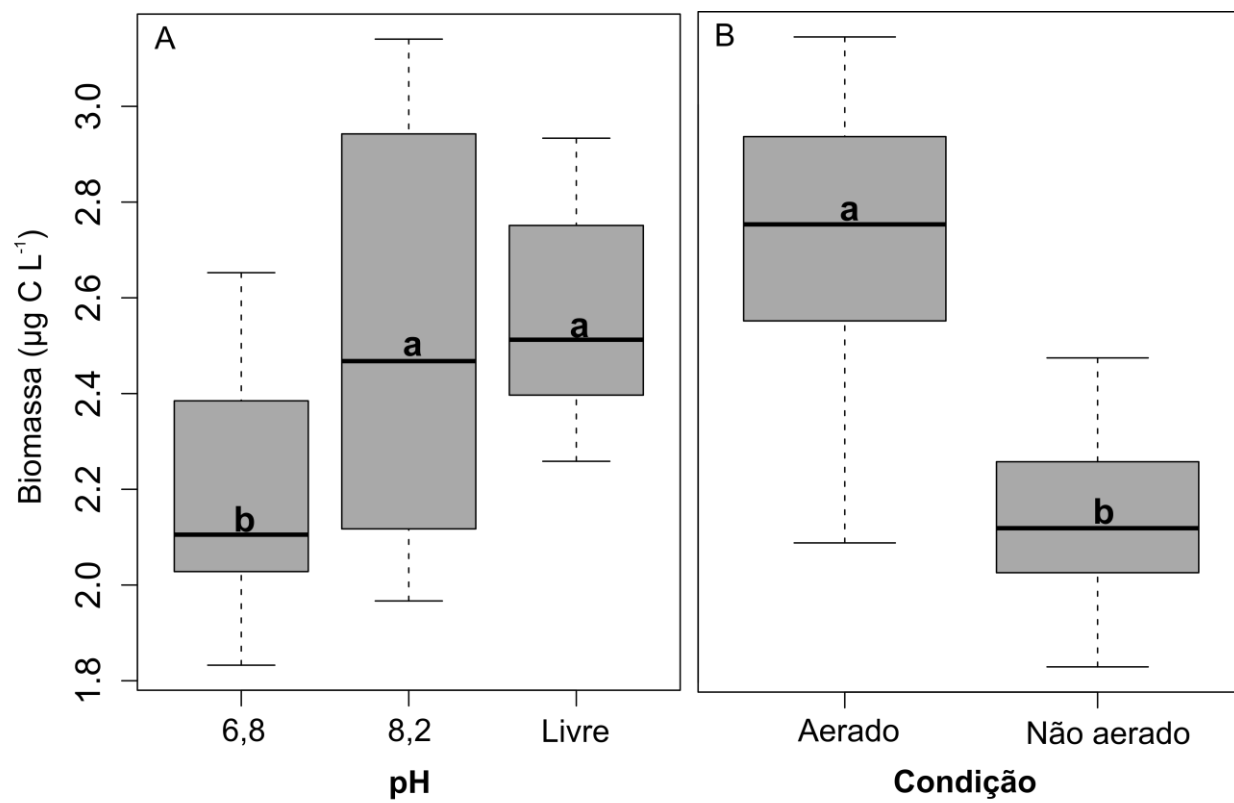


Figura 4.

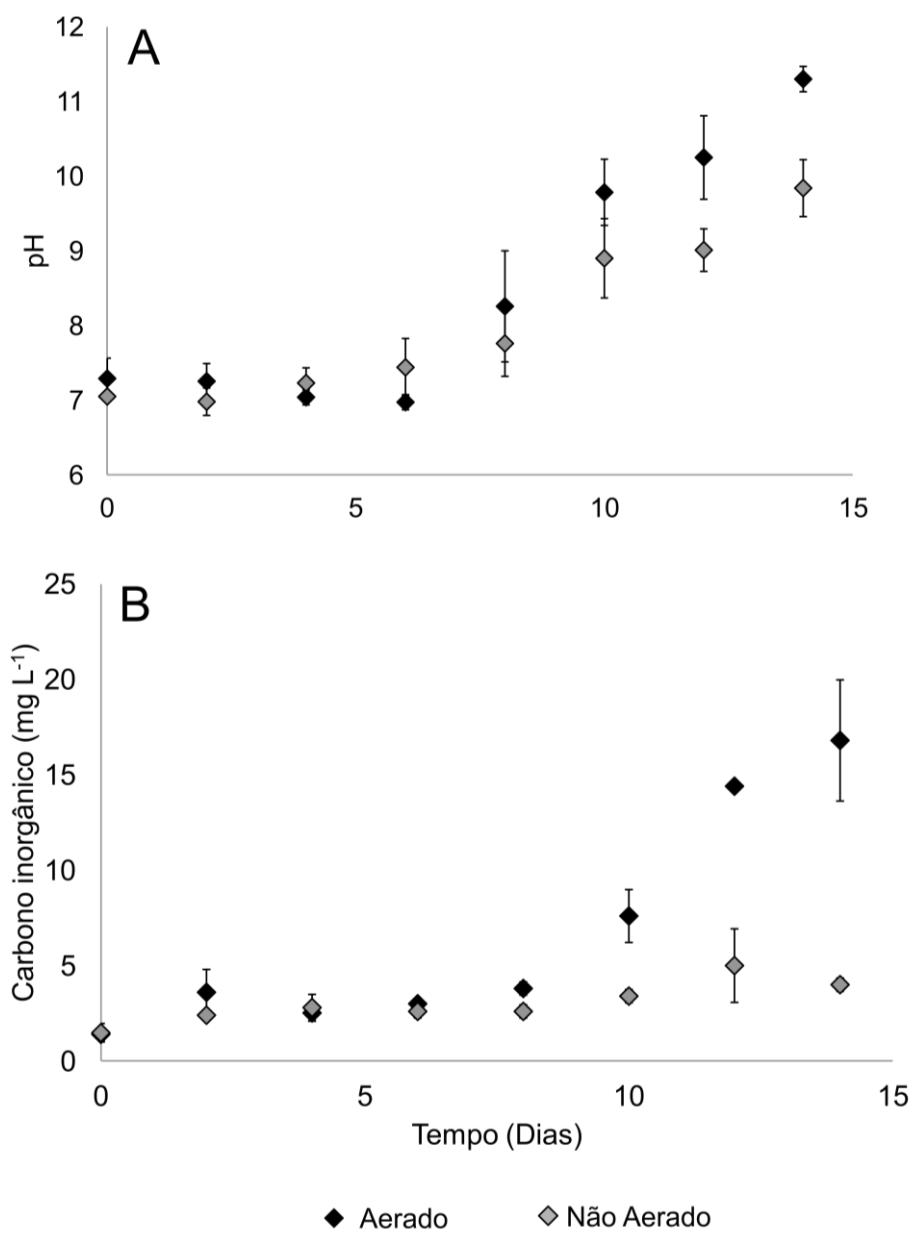


Figura 5.

Tabela 1.

Efeito	dF	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>G-G</i>
Tempo	7	501,77	0,00000	0,000
Tempo*Condição	7	29,67	0,00000	0,000
Tempo*Tratamentos	14	3,67	0,00100	0,000
Tempo*Condição*Tratamentos	14	1,28	0,23869	0,372
Erro	84			

Tabela 2.

pH	V (μm^3)	S (μm^2)	S/V (μm^{-1})	DLM (μm)	Rendimento em biomassa ($\mu\text{g C L}^{-1}$)	Quota de carbono celular (pg C Célula^{-1})
Livre	0,77±0,32 ^(a)	4.88±1,31 ^(a) ;	6.83±1,43 ^(a) ;	84.93±41,42 ^(a) ;	592,50±252,46 ^(a) ;	0.09±0,04 ^(a) ;
	0,70±0,27 ^(b)	4,57±1,22 ^(b)	6,93±1,23 ^(b)	125.68±54,21 ^(b)	242,84±58,56 ^(b)	0.08±0,03 ^(b)
6.8	0,96±0,78 ^(a) ;	5,39±2,42 ^(a) ;	6,47±1,25 ^(a) ;	107.29±54,75 ^(a) ;	271,62±165,07^(a);	0,12±0,10 ^(a) ;
	2,71±1,23^(b)	11,92±3,62^(b)	4,71±0,85^(b)	150.76±59,86 ^(b)	102,21±32,22 ^(b)	0,35±0,16^(b)
8.2	1,11±0,45 ^(a) ;	6,33±1,84 ^(a) ;	6,04±1,00 ^(a) ;	153,29±38,05^(a);	957,19±390,51 ^(a) ;	0.14±0,06 ^(a) ;
	0,87±0,23 ^(b)	5,31±0,98 ^(b)	6,24±0,56 ^(b)	135.98±52,81 ^(b)	121,38±25,34 ^(b)	0.10±0,03 ^(b)

Normas da Revista



Introduction



Types of paper

Original research articles (Regular Articles) Book Reviews Original research articles should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Ethics in Publishing

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association(Declaration of Helsinki) for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the

written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck<http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see<http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult<http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information

see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions:<http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/haralg/>

With your article please also upload the Author Declaration form for this journal,[Please click here](#)

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Harmful Algae has no page charges.



Preparation

Use of wordprocessing software

All papers should all be written in third person, passive voice. It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class elsarticle.cls (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

Article Structure

Manuscripts should be typewritten with numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered in the upper right-hand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the

best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is used, with the exception of common domestic animals.
3. The first mention of the scientific names of the species used in the work - in title or text - should be accompanied by the taxonomic authority unless they can all be referred to a general work in which the authorities are given. Scientific names of species referred to in other studies need no authority. Generic names should only be abbreviated when immediately preceded in the text by the mention of the same species or another of the same genus.
4. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in text. Active ingredients of all formulations should be likewise

identified.

5. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

6. When referring to salinity, please do not use units i.e. no PSU or 0/00. Please use "a salinity of X, or salinity" instead of adding units.

Artwork

Electronic Artwork

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following font in your illustrations: Arial.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- When labelling composite figures, please label as A,B,C, etc. in Arial font, positioned on the upper left corner, on the panel whenever possible. Please do not include any periods, parentheses, etc.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.
- Extra frames and boxes around figures should be eliminated.

Please include only X and Y (and Z if applicable) axes. Background lines on figures should only be included when absolutely necessary.

- Legend material and explanations of symbols, etc. should be on the panel, not hanging off to the side of the figure. No frame is necessary. If this material does not fit on the panel, it should be included in the actual figure legend.
- Submitting figures as they are printed from Excel or other spread sheets is not acceptable formatting for publication.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'. **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition high-resolution black and white versions of all the color illustrations. Simply printing color as black and white is not acceptable.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurements should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
9. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that

the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that. . ." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1993, pp. 12-16)".

3. When reference is made to a work by two authors, both names should be given using "and". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1993a, 1993b, etc. For Volume (Vol.) Bulletin (Bull.), and No., Arabic numerals should be used (not underlined); the full number of pages should be given in the form of pp. 123-128.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Jones, H.D., Richards, O.G., Southern, T.A., 1992. Gill dimensions, water pumping and body size in the mussel *Mytilus edulis* I. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155(2), 213-237.

b. For books

Clark, R.B., 1992. Marine pollution, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.

c. For multi-author books

Hawkins, A.J.S., Baynes, B.L., 1992. Physiological processes, and the regulation of production. In: Gosling, E. (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, pp. 171-222.

6. The name of the journal should be abbreviated according to the International List of Periodical Title Word Abbreviations, published by the International Serials Data Systems; Paris, France.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to

these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/harmful-algae>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

Author's Discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.



Author Inquiries

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.