ESTUDOS DE FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS DE VIDA LIVRE, FIXADORAS DE NITROGÊNIO,
E O ISOLAMENTO DE MUTANTES ESPONTÂNEOS.

ROSANE MARIA DE AGUIAR

ORIENTADOR: PROF^ª. DR^ª SIU MUI TSAI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiróz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Solos e Nutrição
de Plantas.

PIRACICABA

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

ABRIL - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

A282e Aguiar, Rosane Maria de
Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos. Piracicaba, 1992.
122 p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora 2. Cianobactéria - Crescimento I.
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.46

ESTUDOS DE FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS DE VIDA LIVRE, FIXADORAS DE NITROGÊNIO,
E O ISOLAMENTO DE MUTANTES ESPONTÂNEOS.

ROSANE MARIA DE AGUIAR

Aprovada em: 29 de maio de 1992.

Comissão julgadora:

Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

ESALQ/USP

Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

CENA/USP

Prof^a. Dr^a. Marísia Cyreti Forte Pontes

UFV

Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

-ORIENTADORA-

Dedico este trabalho:

À meus pais que, desde cedo, fizeram-me compreender que, somente com dedicação e estudo, é possível evoluir.

À meus filhos que souberam compreender a importância deste trabalho, e me amaram, apesar de toda a minha ausência.

À meu marido Paulo, amigo especial, que esteve sempre comigo, e cujo apoio, incentivo, amor e amizade fizeram dos últimos anos um período especial.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Siu Mui Tsai, pela orientação deste trabalho, pelo incentivo constante e estímulo à pesquisa, pela confiança na capacidade das pessoas, e, principalmente, por ter se tornado uma grande amiga.

À Professora Dr^a Marísia Cyreti Forte Pontes, minha co-orientadora, pelas valiosas sugestões e críticas, pelo exemplo de postura profissional, pela amizade, e pela influência marcante na minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. John C. Meeks, pelo apoio, orientação, ensinamentos e pela amizade, durante o trabalho experimental desenvolvido em seu laboratório na Universidade da Califórnia - Davis.

Aos Pesquisadores: Dr. Alvaro Vargas, Dr. Roberto Bonetti e Marli de Fátima Fiore do CENA/USP, pelo apoio constante, críticas, sugestões e pela amizade.

A Universidade Federal de Viçosa, à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pela

oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

A CAPES/PICD pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq/RHAE e ao Colegiado do BIOAGRO/UFV, pela confiança no meu trabalho, e pela concessão da bolsa de estudos para o Exterior.

A Universidade da Califórnia-Davis e ao Departamento de Microbiologia, pela infra-estrutura oferecida e pela amizade.

Aos funcionários do setor de Microbiologia do Solo/CENA, pelo auxílio durante os trabalhos e pela amizade.

Aos amigos da Pós-graduação, pelos momentos alegres e de descontração, com os quais pude contar durante todos estes anos.

Ao Professor Ricardo Frederico Euclides e Cosme Damião Cruz e ao técnico José Mário Braga Filho, pela orientação na elaboração das análises estatísticas, e pelas críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Frederico Santos Lopes, pelo incentivo, pelas valiosas sugestões, pela contribuição na minha vida profissional e pela amizade.

Às Bibliotecárias Cristina e Angela, (ESALQ/CENA), pela dedicação no atendimento, pela amizade, pelo auxílio durante a elaboração e revisão das referências bibliográficas.

Às Dr^{as}. Célia Leite Sant'Anna e Maria Tereza de Paiva Azevedo - Instituto de Botânica - SP, pela identificação das espécies botânicas estudadas neste trabalho.

À minha família pela confiança, incentivo e carinho.

A todos que colaboraram para que este trabalho se concretizasse, MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Objetivos	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Obtenção de cianobactérias	16
2.1.1. Local e Método de coleta	16
2.1.2. Isolamento de cianobactérias do solo	18
2.1.3. Purificação das cianobactérias selecionadas	19
2.1.4. Manutenção das culturas axênicas de cianobactérias	23
2.1.5. Seleção das espécies	24
2.2. Estudos sobre taxas de crescimento em cianobactérias	27
2.2.1. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias ..	27
2.2.2. Efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias	30
2.2.3. Efeito da salinidade sobre o crescimento de cianobactérias ...	35

2.2.4. Efeito da deficiência de fósforo sobre o crescimento das cianobactérias	37
2.3. Efeito da temperatura sobre a fixação do nitrogênio em cianobactérias	39
2.4. Isolamento de mutantes espontâneos em cianobactérias	41
3. RESULTADOS	45
3.1. Isolamento das cianobactérias	45
3.2. Purificação das cianobactérias	46
3.3. Seleção das espécies	46
3.4. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias	50
3.5. Efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias	55
3.6. Efeito da concentração de sal sobre o crescimento das cianobactérias	58
3.7. Deficiência de Fósforo sobre o crescimento das cianobactérias	61
3.8. Efeito da temperatura sobre a fixação biológica do nitrogênio	65
3.9. Mutantes espontâneos em cianobactérias ..	67
4. DISCUSSÃO	76
4.1. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias	78
4.2. Efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias	83

4.3. Efeito da concentração de sal sobre o crescimento das cianobactérias	86
4.4. Deficiência de Fósforo sobre o crescimento das cianobactérias	89
4.5. Estimativa da fixação biológica do nitrogênio em diferentes temperaturas de incubação	92
4.6. Mutantes espontâneos de cianobactérias ..	97
4.6.1. Mutantes espontâneos resistentes ao MSX	97
4.6.2. Mutantes espontâneos resistentes ao SFC	100
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS DE VIDA LIVRE, FIXADORAS DE NITROGÊNIO,
E O ISOLAMENTO DE MUTANTES ESPONTÂNEOS.

AUTORA: Rosane Maria de Aguiar

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sui Mui Tsai

RESUMO

Quatro espécies de cianobactérias, heterocistadas, fixadoras de nitrogênio: *Westiellopsis yengarii*, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc muscorum* e *Nostoc commune* foram isoladas e clonadas a partir de solos de várzea da região Amazônica e dos tabuleiros irrigados cultivados com arroz do Vale do Paraíba, São Paulo.

Uma espécie de *Nostoc sp.* - ATCC 29133, isolada da raiz de *Macrozamia lucida* (Linnaeus), adaptada à regiões de clima temperado, foi utilizada neste trabalho como parâmetro de comparação entre cianobactérias de solos temperados e tropicais.

As taxas de crescimento das cianobactérias foram avaliadas em termos do conteúdo de clorofila *a* em experimentos onde a temperatura, o pH, a salinidade e a

concentração de fósforo foram variáveis.

A temperatura ótima para o crescimento das cianobactérias de solo tropical variou entre 25° e 35°C e para *Nostoc sp.*, de solo temperado, foi de 20°C; o pH ótimo para o crescimento foi igual a 7,9.

O crescimento das cianobactérias em meio salino mostrou que *N. muscorum* apresentou a maior tolerância e *Nostoc sp.* foi a espécie mais sensível à concentração de 0,2M de NaCl, com reduções no crescimento iguais a 63% e 97%, em relação ao controle, respectivamente.

O crescimento em meio de cultura deficiente em fósforo (P) mostrou que *N. muscorum* teve a menor redução no crescimento (52%), enquanto *N. commune*, a espécie mais sensível a deficiência de P, teve uma redução de 72%.

Estimativas da fixação biológica do nitrogênio, às temperaturas de 20°, 25° e 35°C, através do método de redução do acetileno, indicaram uma baixa atividade da nitrogenase, no período amostral, que variou de 4,87 nmol C₂H₄.µgCl_a⁻¹.min⁻¹ em *N. muscorum* à 25°C a 0,88 nmol C₂H₄.µgCl_a⁻¹.min⁻¹ em *Nostoc sp* à 35°C. A temperatura ótima registrada para a atividade enzimática foi igual a 25°C.

Mutantes espontâneos de *N. punctiforme* e *N.*

muscorum foram obtidos a partir do crescimento em substâncias análogas ao L-glutamato (L-metionina-DL-sulfoximina, MSX) e à citosina (5'-fluorocitosina, 5FC), respectivamente, suplementados ao meio de cultura. Os clones resistentes foram testados juntamente com o tipo selvagem, sendo que a caracterização da mutação espontânea somente foi obtida para *N. muscorum* (+5FC^R), em presença do análogo uracil, 5' Fluorouracil (5FU). Uma estimativa da atividade da nitrogenase mostrou que os mutantes espontâneos fixaram N₂ a taxas mais elevadas que os respectivos tipos selvagens.

ESTUDOS DE FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS DE VIDA LIVRE, FIXADORAS DE NITROGÊNIO,
E O ISOLAMENTO DE MUTANTES ESPONTÂNEOS.

AUTHOR: ROSANE MARIA DE AGUIAR

ADVISER: Dr. SIU MUI TSAI

SUMMARY

Four species of nitrogen fixing heterocystous cyanobacteria: *westiellopsis yengarii*, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc muscorum* and *Nostoc commune* were isolated from soils of varzea (low flooded land) of the Amazon region and flooded rice fields inside the Valley Paraiba, São Paulo state. For the comparison the temperate soil species *Nostoc sp* - ATCC 29133, taken from the roots of *Macrozamia lucida* (Linnaeus) was also included in this study as a control of comparison between cyanobacteria from temperate and tropical soil.

The growth rate of cyanobacteria were evaluated based on Chlorophyll *a* content in one experiment where temperature, pH, salinity and phosphorous concentration were variable. The optimal temperature for

growth of cyanobacteria from tropical region ranged from 25° to 35°C; and, for *Nostoc sp* around 20°C; the optimal pH for growth was equal to 7.9.

Growth of cyanobacteria in saline medium showed that *N. muscorum* had greater tolerance and *Nostoc sp* was the species more sensitive to 0,2M of NaCl, with growth reduction of 63% and 97%, respectively.

Growth on medium with phosphorous (P) deficiency showed that *N. muscorum* had a lower growth reduction (52%) while *N. commune*, the more sensitive specie to phosphorous deficiency had a 72% reduction in growth.

Biological nitrogen fixation estimative at temperature of 20°, 25° and 35°C, using the acetylene reduction methods indicated an activity range for nitrogenase during the sampling period variable between 4,87 nmol C₂H₄ µg Cl₂⁻¹ min⁻¹ for *N. muscorum* at 25°C to 0,88 nmol C₂H₄ µg Cl₂⁻¹ min⁻¹ for *Nostoc sp* at 35°C. The optimal temperature for enzymatic activity was 25°C.

Expontaneous mutants of *N. punctiforme* and *N. muscorum* were achieved when growing in culture medium supplemented with substance like L-glutamate (L-methionine-DL-sulphoximine-MSX) and cytosine (5'fluorocytosine, 5FC) respectively. Resistent clones were isolated, selected and tested at the same time wild type and the characterization

of the expontaneous mutation was achieved only for *N. muscorum* in the presence of 5' fluorouracil (5FU).

Nitrogenase activity estimative showed that expontaneous mutants fixed N_2 at a higher rate when compared to wild types.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cianobactérias são organismos procariontes, fotossintetizantes, igualmente às algas eucarióticas e plantas superiores, apresentando, adicionalmente, a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) (LOURA et alii, 1987).

Na natureza, a fixação biológica de nitrogênio é uma característica específica dos organismos procariontes, e entre estes, as cianobactérias. A eficiência da fixação de N_2 , nas cianobactérias filamentosas, é atribuída a alguns fatores tais como: ocorrência de heterocistos, os quais são células especializadas que estão estrutural e bioquimicamente adaptadas para fornecer um ambiente parcialmente anaeróbico, em que a nitrogenase pode se manter ativa; e a ocorrência de uma separação temporal dos processos de fixação de N_2 e fotossíntese em células vegetativas (STANIER & COZEN-BAZIRE, 1977; STEWART, 1978; WOLK, 1980; MURRAY et alii, 1984; STAL & KRUMBEIN, 1987).

Esta capacidade fotoautotrófica e fixadora de nitrogênio tem despertado o interesse dos pesquisadores

pelas cianobactérias que, de modo especial, tornaram-se atrativas como fontes de biofertilizantes nitrogenados (RAJALAKSHMI, 1985; STEWART *et alii*, 1987; FERNANDEZ-VALIENTE & LEGANES, 1989). Tais atributos permitem, a estes organismos, uma notável diversidade ecológica, e uma ampla distribuição nos diferentes ecossistemas.

Em ecossistemas aquáticos, marinho e de água doce, as cianobactérias são os principais organismos responsáveis pela fixação de nitrogênio, sendo muito estudadas quanto as caracterizações fisiológicas e atividades da nitrogenase (JUTONO, 1973; STEWART, 1971, 1978; ROUND, 1983; STAL *et alii*, 1984; BOLD & WYNN, 1985; STAL & KRUMBEIN, 1985).

No ecossistema de campos limpos das regiões Ártica e Antártida, as cianobactérias e as algas eucarióticas são colonizadoras primárias destes solos, constituindo a maior parte da população (DAVEY, 1988; DAVEY & CLARKE, 1991). Este fato permite aumentar a estabilidade do solo pela agregação das partículas, promovendo o estabelecimento de outros vegetais, como por exemplo os musgos (WYNN-WILLIAMS, 1990). Nestes ambientes de baixas temperaturas, as cianobactérias fixadoras de N_2 parecem ser as responsáveis pela entrada de "novo" nitrogênio, devido as baixas taxas de decomposição (Alexander, 1975, citado por PONTES, 1988).

Entretanto, é no ecossistema solo, e principalmente, nos campos cultivados com arroz irrigado, que as cianobactérias contribuem, substancialmente, para a economia de nitrogénio. Estes ambientes são altamente favoráveis ao crescimento e ao estabelecimento destes organismos, devido aos seus requerimentos de luz, água, temperatura elevada e disponibilidade de nutrientes. Porém, foi observado que, nos campos tropicais da Índia, Filipinas, Mali, Tailândia e Ásia, cultivados com arroz irrigado, a biomassa algal e a fixação de N_2 variaram intensamente com alterações dos fatores físico-químicos, bióticos e climáticos (MacRAE & CASTRO, 1966; WHITTON & CATLING, 1986; BISOYI & SINGH, 1988).

Fatores abióticos e bióticos interferem, decisivamente, no crescimento das cianobactérias. Entre os fatores abióticos, a intensidade luminosa, a temperatura, o pH, a salinidade, e o fósforo são muito importantes para o estabelecimento das cianobactérias, tanto de solo, quanto de culturas mantidas em laboratório (HOLM-HANSEN, 1968; WATANABE & YAMAMOTO, 1971; JUTONO, 1973; SAHA & MANDAL, 1979; ROGER & KULASODORIYA, 1980; ROGER & REYNAUD, 1982; STEWART *et alii*, 1987; BISOYI & SINGH, 1988).

A temperatura ótima para o crescimento de cianobactérias situa-se entre 25° - 35° C, sendo estas temperaturas mais elevadas do que as requeridas por algas

eucarióticas (ROGER & KULASOORIYA, 1980; RIPPKA *et alii*, 1981; e PONTES, 1988). Entretanto, temperaturas elevadas (acima de 40°C) têm efeito deletério sobre a fixação de nitrogênio e a fotossíntese de cianobactérias (ALLEN & STANIER, 1968; HOLM-HANSEN, 1968; FOGG *et alii*, 1973; STEWART, 1978; ROGER & KULASOORIYA, 1980; RIPPKA *et alii*, 1981; VU *et alii*, 1986; WATANABE & SANTIAGO-VENTURA, 1989). Algumas cianobactérias, especialmente as espécies termófilas de *Synechococcus*, apresentam uma acentuada capacidade de tolerar temperaturas de 45°C em laboratório, e geralmente, não crescem abaixo de 30°C. Tais espécies termófilas podem crescer em temperaturas acima de 73°C (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971).

Alta temperatura (acima de 40°C) associada a alta intensidade luminosa constituíram fatores limitantes da atividade da nitrogenase em cianobactérias de solos da África do Sul. Uma diminuição acentuada nas taxas de fixação, durante o período noturno, foram ocasionadas pela queda de temperatura no período, conforme JONES (1977). A variação diurna da redução do acetileno por cianobactérias de solos do cerrado demonstrou a ocorrência de uma atividade máxima de redução no período vespertino, sendo a temperatura e a intensidade luminosa os fatores controladores da atividade enzimática (PONTES *et alii*, 1989). Portanto, as condições ambientais

encontradas no campo, geralmente, resultam em taxas de fixação de nitrogênio sub-ótimas, visto que, na natureza, as condições de luz, temperatura e disponibilidade de água são ótimas somente em curtos períodos de tempo (HENRIKSSON *et alii*, 1975; BISOYI & SINGH, 1988).

ROGER & REYNAUD (1982); ROGER & WATANABE (1986) e WATANABE (1986) mostraram que, entre os fatores que limitam o estabelecimento das cianobactérias no solo, somente o pH e a disponibilidade de fósforo têm sido estudados. Em adição à temperatura, o pH é certamente o fator que mais claramente afeta a distribuição de cianobactérias. Muitas espécies crescem em ambientes que variam de neutro a alcalino (ROGER & REYNAUD, 1979; e RIPPKA *et alii*, 1981); e em culturas de laboratório o valor de pH considerado ótimo situa-se entre 7,5 e 10,0; estando os limites mínimos entre 6,5 e 7,0 (HOLM-HANSEN, 1968). O efeito seletivo do pH sobre a flora algal autóctone e as mudanças ocorridas na população, isto é, espécies de cianobactérias crescidas em solos ácidos, geralmente, diferem das espécies crescidas em solos alcalinos, demonstraram que o crescimento é favorecido em valores de pH mais elevados, acima de 7,0 (ROGER & KULASOORIYA, 1980).

→ HOLM-HANSEN (1968) e FOGG *et alii* (1973) demonstraram que os requerimentos nutricionais das

cianobactérias são iguais aos das plantas superiores em que são exigidos macronutrientes como o fósforo, o potássio, o magnésio, o enxofre e micronutrientes como o cálcio, o ferro, o boro, o molibdênio, o manganês, o sódio e o cobalto.

O fósforo tem sido considerado o principal nutriente que controla o desenvolvimento das populações naturais de cianobactérias. Isto é, dependendo da concentração de fósforo este pode atuar como um fator limitante do crescimento ou, por outro lado, promover o aparecimento de "blooms" (MARCO & DRUS, 1988).

A forma de fósforo comumente absorvido pelos organismos autótrofos parece ser o ortofosfato. Sob condições normais de fornecimento de fósforo, a absorção pelas cianobactérias é uma função hiperbólica em relação a concentração externa de fósforo, mas geralmente esta absorção é modificada em condições de deficiência de P (HEALEY, 1982; SUTTLE & HARRISON, 1986; MARCO & DRUS, 1988). Em cianobactérias, paralelamente ao rápido decréscimo no estoque de P, têm-se observado alterações na composição das principais macromoléculas, decréscimo das taxas fotossintética, respiratória e de fixação de nitrogênio (MARCO & DRUS, 1988).

Outro fator que deve ser considerado, por interferir na distribuição e estabelecimento de

cianobactérias no solo é a salinidade. Esta afeta, aproximadamente, cerca de 30% das terras irrigadas do Planeta e os microrganismos dos solos (JHA *et alii*, 1987).

A salinidade do solo é um problema agrícola importante. O conteúdo elevado de cloreto de sódio é o principal fator limitante ao crescimento de plantas em habitats salinos. Em geral, as cianobactérias exibem considerável tolerância ao sal ou ao estresse osmótico (THOMAS & APTE, 1984). Segundo APTE *et alii* (1987) a recuperação de solos salino/sódico utilizando-se esses organismos têm sido empregado com algum sucesso. Entretanto, as bases fisiológicas e bioquímicas da adaptação osmótica ainda não estão totalmente elucidadas, segundo publicações de THOMAS & APTE (1984) e REEDY *et alii* (1989). Estas consistiriam de no mínimo três processos básicos: acúmulo osmótico intracelular na forma de íons inorgânicos ou solutos orgânicos; processos de transporte de íons e ajustamento metabólico.

LEFORT-TRAN *et alii* (1988) investigando as respostas estruturais e funcionais da cianobactéria lacustre *Synechococcus* 6311, frente a um estresse ambiental com alta salinidade, demonstraram que esta era capaz de sobreviver às súbitas mudanças do meio, em que a concentração de sal era igual a 0,5M de NaCl (próxima a concentração de sal da água do mar). As alterações

ocorreram à partir da entrada rápida do sódio na célula, implicando na alteração temporária da liberação de O_2 fotossintético e diminuição do nível de nucleotídeos trifosfatos. As células exibiram elevada troca de sódio/próton, aumento do limite de plasmólise e aumento de concentração intracelular de osmoreguladores (sacarose, glucose, potássio e glicogênio).

Contudo, as cianobactérias apresentam um requerimento específico de sódio para o crescimento (ALLEN & ARNON, 1955). A ausência de sódio no meio promove modificações na fotossíntese, na assimilação de nitrato e na fixação de N_2 (APTE *et alii*, 1987; FERNANDEZ-VALIENTE *et alii*, 1988; NIEVA *et alii*, 1990). Segundo FERNANDEZ-VALIENTE *et alii* (1988) estas alterações metabólicas resultam, subsequentemente, em um decréscimo no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e na morte fotooxidativa das células. A inibição da fotossíntese, segundo o autor, é o primeiro efeito da deficiência do sódio sobre o metabolismo, precedendo as alterações de assimilação de nitrogênio. O requerimento do sódio para a fotossíntese foi sugerido resultar do envolvimento do sódio no transporte ativo de carbono inorgânico. Também existem crescentes evidências de que o requerimento de sódio para o crescimento e fotossíntese pode ser substituído por níveis elevados de CO_2 , ou baixo valor de pH do meio.

Desde 1928, através dos trabalhos de DREWES (citado por STEWART, 1973) é sabido que as cianobactérias fixam nitrogênio em culturas puras de *Nostoc* e *Anabaena* sp., exibindo um aumento no conteúdo total de nitrogênio no meio de cultura onde não havia nitrogênio combinado.

No sistema biológico, o processo de fixação de nitrogênio, catalizado pela enzima nitrogenase, consiste na conversão do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3). Uma das características importantes da reação é a quantidade de energia consumida, a qual é resultante da respiração, através da quebra da molécula de glicose, ou de outros carboidratos, fornecendo energia na forma de ATP. A amônia resultante do processo de fixação de nitrogênio poderá ser excretada ao meio, nesta forma, ou como nitrogênio orgânico combinado, podendo ser assimilada pelas plantas superiores, algas, fungos ou bactérias (FRITZ-SHERIDAN, 1988).

Pesquisas sobre a fixação biológica do nitrogênio têm despertado o interesse especial dos pesquisadores pelas cianobactérias, principalmente aquelas de solos cultivados com arroz irrigado, que têm revelado contribuir, substancialmente, para a economia de N nos solos, e ao mesmo tempo, contribuindo para diminuir a demanda de fertilizantes nitrogenados.

Algumas publicações têm demonstrado a

importância das cianobactérias e sua utilização como biofertilizantes nitrogenados em campos de arroz irrigado, nos Países onde o arroz faz parte da dieta diária da população (VENKATARAMAN, 1981; STEWART *et alii*, 1987; THOMAS *et alii*, 1990). Algumas destas espécies de cianobactérias que prosperam nos campos de arroz inundado liberam pequenas quantidades do principal produto fertilizante, a amônia, durante o crescimento ativo, porém, a maior parte dos produtos fixados estão disponíveis, principalmente através da autólise e da decomposição microbiana. Sob essas circunstâncias, torna-se difícil controlar o fluxo de compostos nitrogenados necessários ao desenvolvimento da planta de arroz.

STEWART (1978) apontou como desvantagens para o uso de cianobactérias como biofertilizantes o fato de que: primeiro, o nitrogênio fixado será liberado somente quando o organismo morrer; segundo, a forma de liberação do nitrogênio pode não ser prontamente assimilada pela cultura; terceiro, o nitrogênio liberado não estará disponível apenas para a cultura para a qual a cianobactéria foi crescida. Uma possível solução apontada recentemente por THOMAS *et alii* (1990) é a de produzir espécies mutantes de cianobactérias, capazes de liberar continuamente amônia ao meio, permitindo seu uso mais eficiente como biofertilizante.

Estudos sobre a seleção de espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, com potencial para atuarem como biofertilizantes nitrogenados, promovendo o aumento da produtividade agrícola, têm sido ressaltados por STEWART *et alii* (1987). Segundo os autores, as espécies selecionadas dotadas de tais potencialidades, os mutantes, para serem usados no campo devem possuir algumas características próprias como: (a) capacidade de crescimento rápido em meio contendo o N_2 como fonte de nitrogênio; (b) capacidade de reduzir compostos de enxofre, como também água, para fornecer elétrons para a fotossíntese; (c) eficiente hidrogenase que previna o desperdício de H_2 gerado pela nitrogenase; (d) capacidade de crescer autotrófica, heterotrófica e fotoheterotroficamente; (e) capacidade de estocar o excesso de carbono fixado na presença de luz, a fim de sustentar a atividade da nitrogenase no escuro; (f) tolerar amplas variações de temperatura, salinidade e pH, suportar a dessecação, herbicidas e predação; (g) capacidade para continuar a fixar N_2 em presença de elevadas concentrações de nitrogênio combinado exógeno. Entre todas as características citadas acima, três têm merecido atenção especial dos pesquisadores, segundo os próprios autores. Para uso no campo é importante : (1) obter mutantes de cianobactérias que fixem nitrogênio,

mesmo em presença de doses elevadas de nitrogênio combinado. Este fato é especialmente importante, visto que as cianobactérias são utilizadas como um suplemento dos fertilizantes químicos nitrogenados. Os procedimentos comuns, nestes casos, têm sido produzir mutantes defeituosos quanto a atividade da GS (glutamina sintetase), utilizando-se substâncias análogas, tais como metilamônio, etilenodiamina e o análogo L-glutamato, L-metionina-DL-sulfoximina (MSX). Entretanto, o maior problema a ser enfrentado é que tais mutantes, em geral, crescem lentamente e não têm condições de competir com as espécies selvagens do campo; (2) obter mutantes resistentes aos herbicidas mais comumente usados, os quais inibem a transferência de elétrons no processo fotossintético, ocasionando a morte da flora cianobacteriana no solo, e reduzindo o "input" de nitrogênio biológico; (3) obter mutantes tolerantes à salinidade e a dessecação.

Mutantes de *Anabaena variabilis* e *Nostoc muscorum*, resistentes ao análogo L-glutamato, L-metionina-DL-sulfoximina (MSX) têm sido relatadas em diversas pesquisas (CHAPMAN & MEEKS, 1983; GURUDUTTA et alii, 1987; CHAPMAN & MEEKS, 1987; STEWART et alii, 1987; REGLINSKI et alii, 1989). THOMAS et alii (1990) tem ressaltado que a reinoculação de mutantes que excretam amônia em seus

ambientes de origem têm demonstrado melhores resultados, em termos de competitividade e reestabelecimento, do que os mutantes derivados de habitats diferentes.

Condições ótimas para a produção de mutantes em cianobactérias, utilizando-se o análogo 5'-fluorocitosina (5FC), foram determinadas em *Anacystis nidulans*; *Aphanocapsa* sp. 6714, e *Plectonema boryanum* por HERDMAN & CARR (1972); ASTIER *et alii* (1979) e Singh & Kashyap em 1977 citados por CHAPMAN & MEEKS (1987). Para *Anabaena variabilis*, CHAPMAN & MEEKS (1987) definiram como condições ótimas de mutação o tratamento preliminar com N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG) seguido por uma seleção positiva para a resistência utilizando-se o análogo 5'-fluorocitosina (5FC). Estes trabalhos, entretanto, mostraram que tais mutantes auxotróficos, resistentes aos análogos, ainda não têm merecido a atenção dos pesquisadores em um estudo sistemático..

Os progressos na área de genética, à partir da obtenção de mutantes de cianobactérias, são escassos, este fato se deve, em parte, as dificuldades no isolamento dos mutantes específicos para análises genéticas subsequentes pela transformação ou conjugação (WOLK *et alii*, 1984).

Quanto aos fatores bióticos que limitam o crescimento e o estabelecimento de cianobactérias em

campos de arroz inundado, incluem-se: os patógenos (bactérias, fungos e vírus), as relações antagonísticas entre os organismos, e o "grazing". Dentre estes, o "grazing" têm sido o mais estudado. O desenvolvimento de populações de zooplâncton, como Cladoceras, Copépodos, Ostracodas, larvas de mosquito, etc., impedem o estabelecimento do inóculo causando o desaparecimento de "blooms" de cianobactérias dentro de apenas uma a duas semanas (ROGER & KULASOODRIYA, 1980; ROGER & REYNAUD, 1982; ROGER & WATANABE, 1986).

No Brasil, estudos que caracterizem fisiologicamente o crescimento das cianobactérias fixadoras de nitrogênio, em ecossistemas terrestres, de modo especial em solos irrigados cultivados ou não com arroz, são praticamente inexistentes. Tais pesquisas são de fundamental importância para a compreensão dos organismos, sob o ponto de vista fisiológico, permitindo um manejo adequado destes no ecossistema. Dentro desta linha de pesquisa é importante ressaltar o trabalho pioneiro de PONTES (1988), em solo de cerrado e casa de vegetação, sobre a contribuição do N biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre, que mostrou a importância do papel desempenhado pelas cianobactérias na contribuição de nitrogênio para o solo, e como biofertilizante para a cultura de arroz irrigado.

1.1. Objetivos

O presente estudo visou os seguintes objetivos:

- Isolar, selecionar e cultivar clones axênicos de cianobactérias do solo de diferentes habitats;
- Estudar o crescimento das cianobactérias em função da temperatura, do pH, da salinidade, e da deficiência de fósforo;
- Analisar os efeitos da salinidade, e da deficiência de fósforo sobre a produção de acinetos;
- Estimar a fixação biológica do nitrogênio em culturas axênicas em função da temperatura;
- Produzir e caracterizar mutantes espontâneos de cianobactérias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção de cianobactérias

2.1.1. Local e método de coleta

As cianobactérias foram obtidas a partir de amostras de solo representativas de duas áreas distintas:

A) Vale do Paraíba - São Paulo

Em 30 e 31 de janeiro de 1990 foram feitas coletas de solo em tabuleiros cultivados e não cultivados com arroz irrigado, situados em Pindamonhangaba/SP.

As amostragens foram feitas em duplicatas, sendo que repetições em um mesmo local ocorreram quando observou-se crescimento colonial diferenciado. As amostras foram obtidas utilizando-se uma espátula e retirando-se uma camada superficial de solo úmido de aproximadamente 2 cm. Este material foi, então, acondicionado em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com água destilada, a fim de evitar o ressecamento das amostras.

Estas placas foram devidamente

identificadas e acondicionadas em geladeiras de isopor, com gelo, e transportadas para o Laboratório de Plantas Inferiores da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, onde foi feito o isolamento dos organismos, em um período de 48 horas imediatamente após a coleta.

B) Várzea Amazônica

As amostras de sedimentos de várzea representativas de áreas diferentes da região amazônica foram coletadas pelos pesquisadores da Seção de Hidrologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP, entre os anos de 1982 e 1985. As amostras permaneceram guardadas em sacos plásticos devidamente identificados. Foram vários locais de coleta entre os municípios de Santo Antônio do Içá (AM) e de Óbidos (PA); entretanto, neste trabalho, apenas as cianobactérias isoladas nas várzeas de Mari e Paura foram estudadas.

Com a finalidade de promover a germinação dos acinetos, as amostras de solo seco de várzea foram homogeneizadas individualmente com água destilada e colocadas em bandejas plásticas, cobertas com filó duplo, a fim de evitar a colonização por insetos. Este sistema foi deixado em repouso em casa de vegetação (CENA/USP), a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/escuro, para o estabelecimento das cianobactérias.

Após o aparecimento dos organismos, o que ocorreu em aproximadamente 10 a 14 dias, o solo foi utilizado no isolamento de cianobactérias heterocistadas, no laboratório da Seção de Microbiologia, CENA/USP.

2.1.2. Isolamento de cianobactérias do solo

Para o isolamento das cianobactérias, tanto do Vale do Paraíba quanto da Várzea Amazônica, utilizou-se a técnica de diluição em série (ALLEN, 1973), em que 1 g do solo homogeneizado foi retirado e adicionado em 9 ml de meio BG-11 líquido (ALLEN & STANIER, 1968, modificado por PONTES, 1988).

O meio BG-11 foi utilizado sem adição de nitrogênio combinado, visando obter somente cianobactérias aeróbias fixadoras de nitrogênio.

Foram feitas diluições em séries de 10^{-1} a 10^{-5} , em tubos de ensaio, de acordo com a metodologia descrita por PONTES (1988). Os tubos foram colocados em câmaras de crescimento sob condições fotoautotróficas, ou seja, à temperatura de 25°C e iluminação constante de 7.0 Wm^{-2} , provenientes de lâmpadas frias fluorescentes.

Após 2 semanas, cada tubo de diluição em série foi examinado macroscopicamente, a fim de se

constatar visualmente a existência de colônias de cianobactérias. Estas foram retiradas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferidas para placas de Petri contendo meio BG-11 solidificado com 1,2% (P/V) de ágar. As placas foram vedadas com "parafilm" e incubadas nas mesmas condições anteriores de luz e de temperatura. Semanalmente, com o auxílio de uma alça de platina, foram isolados aqueles organismos que apresentavam crescimento diferenciado. Estes inóculos eram transferidos para novas placas com meio BG-11 sólido, utilizando-se técnicas bacteriológicas padrão. Após a obtenção destes isolados, os mesmos foram enviados para o Instituto de Botânica, São Paulo, onde foi realizada a identificação taxonômica dos organismos.

2.1.3. Purificação das cianobactérias selecionadas

Os isolados obtidos em condições não-axênicas foram purificados através da fragmentação de filamentos, e o estriamento das células de acordo com ENDERLIN (1986).

A obtenção de clones axênicos de cianobactérias foi feita colocando-se 1 a 2 ml de uma suspensão de células, em meio basal líquido AA (ALLEN &

ARNON, 1955 - Tabela 1) com aproximadamente 20 μg de clorofila a/ml . Os filamentos foram fragmentados, durante 3 min., usando um aparelho de ultra-som (Branson Cleaning Equipment Co.; modelo B-12; Shelton, CT), até a obtenção de uma média de 2 a 4 células por filamento, conforme determinação microscópica. A cultura fragmentada foi lavada 3 vezes através da suspensão em meio AA diluído 4 vezes (AA/4) e esterilizado. A cada lavagem a suspensão era centrifugada durante 5 minutos a 1000 Xg. Após a última centrifugação, o sedimento obtido de cada espécie foi estriado em meio sólido AA suplementado ou não com NH_4Cl . O enriquecimento do meio consistia em adicionar 2,5 mM de NH_4Cl , e tamponá-lo com 5 mM de MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanosulfônico; Sigma), ajustando-se o pH para 7,9 com NaOH 1,0 N. A complementação do meio de cultura com NH_4Cl evita o decréscimo do número de células viáveis (WILCOX *et alii*, 1975). Para a solidificação do meio utilizou-se ágar purificado conforme a metodologia desenvolvida por BRAUN & WOOD (1962). As placas inoculadas foram incubadas em condições fotoautotróficas durante dez dias.

Tabela - 1. Composição e preparo do meio basal líquido - AA - de ALLEN & ARNON (1955).

REAGENTES	QUANTIDADE
-----------	------------

I. -Pi solução estoque

1) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20g/500 ml
2) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	6g/500 ml
3) NaCl	20g/500 ml
4) Micronutrientes	

Para obtenção da solução estoque de -Pi, combine todas as soluções estoque na proporção de 1:1:1:1, e guarde em geladeira a 4°C.

Solução estoque de micronutrientes

1) H_2O destilada e deionizada	1090 ml
2) Solução A & A Fe-EDTA (ver abaixo)	160 ml
3) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	360 mg
4) MoO_3 85% de pureza, ou: $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (99% de pureza)	36 mg 611 mg
5) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	44 mg
6) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	15,8 mg
7) H_3BO_3	572 mg
8) NH_4VO_3 (NH_4^+ metavanadato)	4,6 mg
9) $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	8 mg

Adicionar todos os componentes na ordem listada. Aguardar a total dissolução de cada um. Agitar sempre antes de usar.

Solução A & A Fe-EDTA

1) Dissolver 5.2 g de KOH em 186 ml de água destilada e deionizada.

Adicionar 20.4 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

2) Dissolver 13,7 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 364 ml de H_2O destilada e deionizada ou usar $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Esta solução é turva mas torna-se clara quando misturada a (1).

3) Misturar as soluções (1) e (2).

4) Filtrar em filtro Millipore (0,45 mm) e aguardar a mudança de coloração (marrom escuro/marrom alaranjado).

5) Guardar em geladeira a 4°C

II. +Pi solução estoque

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

28g/500ml

ou

K_2HPO_4 anidro

21,4g/500ml

2.1.4. Manutenção das culturas axênicas de cianobactérias

Todas as culturas axênicas de cianobactérias foram mantidas em meio líquido AA/4 isento de nitrogênio combinado. Este meio foi escolhido por que foi observado que nele todos os isolados apresentavam crescimento mais evidente e por formar menos precipitados após a autoclavagem. As culturas líquidas de cianobactérias foram crescidas em frascos Erlenmeyer, com capacidade de 125 ml, contendo 2/5 do volume de meio basal, sob agitação constante de 110 rpm, e condições fotoautotróficas.

Para as culturas crescidas em meio sólido foi utilizado o meio basal AA solidificado com ágar purificado. As mesmas foram incubadas sob condições fotoautotróficas.

Tanto as culturas líquidas quanto as culturas sólidas foram checadas para contaminantes heterotróficos, periodicamente, em intervalos de 8 a 10 dias, através de exames ao microscópio estereoscópico e plaqueamento em nutriente-ágar.

2.1.5. Seleção das espécies

Com a finalidade de selecionar as espécies de cianobactérias que foram utilizadas nos experimentos posteriores, procedeu-se a avaliação do crescimento das mesmas. Para tanto, foram utilizados como parâmetros: a observação visual, a eficiência de plaqueamento (ENDERLIN, 1986) e a análise do crescimento ou produção de biomassa, através do conteúdo de clorofila *a* (MEEKS *et alii*, 1983).

Utilizando-se um ultra-som, filamentos de cianobactérias com 10 a 15 dias de idade foram fragmentados até serem reduzidos a uma média de 2-4 células por filamento, conforme a técnica anteriormente descrita. Para se obter um inóculo com 200 fragmentos de cianobactérias, utilizou-se a técnica de diluição em série (ALLEN, 1973) acoplada à contagem de células em hemacitômetro. Os resultados foram expressos em c.f.u. (unidades formadoras de colônia), considerando que um c.f.u. de um organismo filamentoso é equivalente ao número total de células no filamento.

A eficiência de plaqueamento foi determinada nas culturas crescidas em meio basal contendo amônio. Utilizou-se a técnica de diluição em série de filamentos fragmentados seguido de plaqueamento em meio

sólido suplementado com 5 mM de MOPS e 2.5 mM de NH_4Cl , cujo pH foi ajustado para 7,9 com NaOH 1,0 N. As placas foram incubadas a 25°C sob condições fotoautotróficas durante 10 dias.

O parâmetro utilizado como indicador de produção de biomassa foi o conteúdo de clorofila *a*, segundo a metodologia descrita por MEEKS *et alii* (1983).

Para a extração da clorofila *a*, utilizavam-se alíquotas das culturas estoques de cianobactérias transferindo-as para tubos cônicos de centrifuga, com capacidade para 25 ml. Estes eram centrifugados durante 10 minutos à velocidade de 1000 Xg, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento era ressuspendido e centrifugado 3 vezes seguidas em meio basal líquido AA/4. Após a última lavagem, o sedimento era ressuspendido em metanol a 100%, submetido a vigorosa agitação em "Vortex", deixando a suspensão em repouso durante 10 minutos no escuro, a fim de se obter extração máxima de clorofila. Decorrido esse período, novamente os tubos eram submetidos a vigorosa agitação e centrifugados à velocidade de 1000 Xg, por 5 minutos, com a finalidade de separar o sobrenadante do sedimento.

O crescimento das cianobactérias foi monitorado através de mudanças na densidade ótica da

amostra com um espectrofotômetro Beckman Modelo DU-70. A determinação da absorvância do extrato metanólico foi lida a um comprimento de onda de 665 nm (A_{665}), usando-se o metanol puro como padrão (branco).

A concentração de clorofila a foi calculada segundo a fórmula descrita por MEEKS & CASTENHOLZ (1971):

$$C = A/\alpha d, \text{ onde:}$$

C = concentração de clorofila ($\mu\text{gCl}a/\text{ml}$)

A = absorvância;

d = comprimento da cubeta (1 cm);

α = coeficiente de absorvância específica em $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que para o metanol é igual a 78,74 a 665 nm.

Após a seleção das espécies, todos os experimentos posteriores foram feitos a partir de culturas líquidas estoques (AA/4, 1955) axênicas, incubadas à temperatura de 25°C , iluminação constante de 7.0 Wm^{-2} , sob constante agitação de 110 rpm, ou seja, em condições fotoautotróficas de crescimento. Estas culturas eram checadas periodicamente para se constatar a ausência de contaminantes heterotróficos.

Uma espécie de cianobactéria isolada a

partir da raiz de cicadácea *Macrozamia lucida* (Linnaeus), originária da Austrália, designada por RIPPKA (1979) como ATCC 29133, do gênero *Nostoc*, totalmente adaptada ao clima de região temperada, foi escolhida como termo de comparação entre cianobactérias tropicais e temperadas.

2.2. Estudos sobre taxas de crescimento em cianobactérias

2.2.1. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias

A partir das culturas estoques, com idades entre 10 a 15 dias, um volume de 10 ml era centrifugado em velocidade de 1000 Xg, durante 10 minutos. O sedimento era homogeneizado com o auxílio de uma seringa estéril, até que todos os grumos fossem rompidos e fosse obtida uma solução homogênea de cianobactérias. Aliquotas de 200 µl dessa solução eram colocadas em frascos Erlenmeyer com capacidade de 50 ml, contendo 20 ml de meio basal AA/4 estéril, isento de nitrogênio combinado e pH 7,9 ajustado com NaOH 1,0 N.

A razão para o uso de pequeno volume de inóculo (200 µl em 20 ml de meio basal), foi devido ao

fato de que, em dois ensaios iniciais, observou-se que volumes de inóculos maiores obtidos a partir de culturas em fase exponencial de crescimento não forneceram fases distintas do crescimento durante o experimento.

Para cada tratamento, eram preparados 9 frascos com uma repetição para as cinco espécies em estudo. Esses eram vedados com tampões de algodão envoltos em gaze dupla e colocados para crescer em câmaras de crescimento, nas temperaturas de 20°C, 25°C e 35°C. Os frascos eram mantidos sob iluminação constante, proveniente de lâmpadas fluorescentes (luz fria), com intensidade luminosa ao redor de $66 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e agitação constante (110 rpm).

A escolha das temperaturas foi baseada nas médias de temperaturas características para cada ecossistema de origem das espécies em estudo.

A avaliação do crescimento das cianobactérias foi determinado durante um intervalo de 14 dias de experimento, através da variação do conteúdo de clorofila *a*.

O tempo de geração foi calculado para cada espécie, nas 3 temperaturas estudadas, durante a fase de crescimento exponencial (fase log).

O efeito da temperatura sobre o crescimento

das cianobactérias foi analisado estatisticamente, utilizando-se o Software SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa. O modelo logístico foi escolhido por ser amplamente utilizado para explicar fenômenos biológicos (HOFFMANN & VIEIRA, 1977). Por essa razão, tem sido empregado na representação de dados de crescimento de animais e de vegetais.

Por meio do modelo logístico foram feitas as avaliações do crescimento das cianobactérias em diferentes temperaturas de incubação. Este modelo é expresso matematicamente como:

$$Y = \frac{A}{(1+be^{-kT})}, \text{ onde:}$$

Y = incremento de biomassa em qualquer tempo T;

A = distância entre duas assíntotas, fornece a intensidade máxima de crescimento;

b = constante de integração sem valor biológico

k = taxa de velocidade de acréscimo de biomassa;

T = tempo em minutos.

2.2.2. Efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias

O efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias foi avaliado tomando-se por base o pH do solo de origem, conforme a Tabela 2, sendo selecionados valores de pH iguais a 5,5, 6,5, 7,0 e 7,9.

A temperatura que proporcionou a melhor taxa de crescimento, ou seja, temperatura de 25°C, foi utilizada como temperatura padrão para esse estudo.

O meio basal utilizado foi AA/4 líquido isento de nitrogênio combinado. O seu pH normal, antes da autoclavagem, geralmente é maior ou igual a 7,8 diminuindo após o resfriamento, alcançando valores entre 7,0 a 7,2. Os diferentes valores de pH estudados foram obtidos da seguinte maneira:

a) pH 5,5

O meio AA/4 foi preparado como de rotina em um frasco Erlenmeyer com capacidade para 1l, sendo o pH igual a 7,9, antes da autoclavagem. Posteriormente, esse valor era ajustado para 5,5 com HCl 1N. Sub-amostras deste meio (20 ml) eram distribuídas em 2 frascos Erlenmeyer de

Tabela - 2. Valores de pH das amostras de sedimentos de várzea coletadas na região amazônica e de solos da região do Vale do Paraíba.

LOCAL	pH	ESPÉCIE ISOLADA
Mari	6,1 - 7,1	<i>Westiellopsis yengarii</i> (AM1a)
Paura	5,7 - 6,5	<i>Nostoc punctiforme</i> (AM91a)
Quadra 2	3,7 - 4,0	<i>Nostoc muscorum</i> (P162a)
Pôlder 4	3,7 - 4,0	<i>Nostoc commune</i> (P168a)

50 ml, cuja finalidade era permitir medidas de pH após a autoclavagem. O conjunto era autoclavado por 20 minutos, após os quais permanecia em agitação constante (110 rpm) durante 24 horas para total resfriamento. Decorrido esse período, fez-se a primeira leitura do pH, somente nos frascos de 50 ml, e obteve-se valores variando entre 5,5 a 5,6. Volume adequado de solução 2,5 mM do tampão MES [2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico; SIGMA] estéril, previamente preparada, com pH igual a 5,5, era acrescentada ao meio AA/4 estéril dos frascos, em câmara de fluxo laminar. Novamente, o conjunto era deixado sob agitação por mais 24 horas, após as quais fez-se a segunda leitura, obtendo-se o valor desejado de pH.

b) pH 6,5

Para obtenção do meio AA/4 com pH igual a 6,5, seguiu-se, basicamente, o mesmo procedimento anterior. As alterações realizadas foram feitas no pH do meio, ajustando-o para 6,5 antes da autoclavagem e na solução tampão de 2,5 mM de MES cujo pH foi alterado para 6,5. Após 24 horas de resfriamento com agitação constante do meio AA/4 foi feita a primeira leitura do pH, obtendo-se valores de 6,5 a 6,6. A seguir, foi adicionada

a solução tampão em todos os frascos os quais permaneceram em agitação por mais 24 horas. Após esse período, foi feita a segunda leitura de pH, obtendo-se o valor desejado.

c) pH 7,0 e 7,9

Dois frascos Erlenmeyer contendo cada um 1 l do meio AA/4 foram usados na obtenção dos valores de pH correspondente a 7,0 e 7,9. Duas repetições para cada pH foi preparada em frascos de 50 ml contendo o mesmo meio. Os procedimentos básicos foram os mesmos já citados.

O pH inicial, para ambos, foi igual a 7,9 antes da autoclavagem. Após 24 horas de resfriamento e agitação constante a primeira leitura de pH apresentou valores entre 7,0 e 7,2 para ambos. O frasco com pH igual a 7,0 foi reservado. Ao frasco cujo pH era igual a 7,2 foi acrescentado solução tampão 5 mM de MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanosulfônico; SIGMA], previamente preparada, com pH ajustado para 7,9. Após esse procedimento, todos os frascos foram mantidos por mais 24 horas sob agitação, quando procedeu-se a segunda leitura do pH, obtendo-se os valores de pH desejados.

A escolha dos tampões MES e MOPS para este

experimento teve como modelo o trabalho de ENDERLIN & MEEKS (1983).

Em ambos os tratamentos, onde o meio AA/4 sofreu decréscimo do pH (tratamentos pH 5,5 e 6,5), não foram observadas alterações do mesmo, como por exemplo, precipitação dos constituintes.

Para cada um dos tratamentos eram preparados 3 frascos Erlenmeyer com 20 ml de meio AA/4 com os valores desejados de pH. Em cada um dos frascos eram inoculados 200 μ l de inóculo de cianobactérias, utilizando-se as técnicas bacteriológicas padrão. Cada tratamento teve duas repetições. Foram feitas leituras de pH e de determinação de biomassa através do conteúdo de clorofila *a* durante 1 semana em intervalos de 48 horas.

Avaliaram-se os resultados do efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias aplicando-se um modelo de regressão múltipla, tendo como variáveis independentes o pH e o tempo.

Utilizou-se o seguinte modelo:

$$Y = b_0 + b_1 * pH + b_2 * pH^2 + b_3 * T + b_4 * T^2 + b_5 * pH * T,$$

em que:

Y = produção de biomassa expressa em termos de clorofila *a*;

b_0 = constante;

b_1 ; b_2 ; b_3 ; b_4 ; b_5 = coeficientes de regressão;

pH = pH estudados;

T = tempo em minutos.

A análise de regressão múltipla foi feita por meio do Software SAEG (citado no item 2.2.1.).

2.2.3. Efeito da salinidade sobre o crescimento de cianobactérias

O efeito da salinidade sobre o crescimento das cianobactérias selecionadas foi observado neste experimento através da variação do conteúdo de clorofila *a* e da formação de acinetos.

O experimento conduzido avaliou 3 níveis diferentes de sal, cujas concentrações foram iguais a 0,0, 0,1 e 0,2 M de NaCl no meio AA/4, isento de nitrogênio combinado.

O tratamento controle (0,0 M de NaCl) foi aquele em que a concentração de sal era igual a 0,004 M correspondente a concentração de sal, normalmente utilizada na composição do meio AA/4, conforme mostra a

Tabela 1. Os tratamentos 0,1 e 0,2 M consistiram na adição das referidas concentrações molares ao meio líquido AA tamponado com 5 mM de MOPS e pH ajustado para 7,9, antes de ser autoclavado.

As diferentes soluções foram distribuídas em tubos de ensaio e vedadas. O conjunto foi autoclavado durante 20 minutos, resfriado e inoculado com culturas puras de cianobactérias (100 μ l de inóculo em 10 ml de meio basal), usando-se as mesmas técnicas anteriores. Quatro tubos de ensaio foram preparados para cada tratamento, num total de 12 tubos por espécie. Os tubos de ensaio foram colocados em suporte para tubos inclinados, o que permitia uma maior exposição das culturas à luz, dentro de câmaras de crescimento, sob condições de crescimento fotoautotrófico e agitação constante (110 rpm) durante um período de 7 dias. Decorrido este período, foram feitas avaliações do crescimento através do conteúdo de clorofila *a*.

O efeito da salinidade sobre o desenvolvimento de acinetos foi observado através da contagem dessas células em um hemacitômetro, no final do experimento. Por medida de segurança, foram feitas, também, novas medidas de pH.

Para estudar o efeito de diferentes

concentrações de sal sobre o crescimento das cianobactérias usou-se um delineamento composto de 5 tratamentos, considerando cada espécie de cianobactéria como um tratamento e duas repetições.

As comparações entre as médias dos tratamentos foram feitas pelo teste de Newman Keuls, ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.4. Efeito da deficiência de fósforo sobre o crescimento das cianobactérias

Para o estudo do efeito da concentração de fósforo (P) sobre o crescimento e formação de acinetos em cianobactérias, foram preparados meios de cultura com doses decrescentes de P no meio basal líquido (AA/4), isento de nitrogênio combinado. Foram utilizados neste experimento concentrações iguais a 4×10^{-2} ; 3×10^{-3} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} e 2×10^{-5} M de P na forma de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$. A concentração de P normalmente usada na composição do meio AA/4 foi considerada como tratamento controle, com a concentração igual a 4×10^{-2} M de P. Para cada tratamento eram preparados 2 tubos de ensaio.

O meio basal líquido foi preparado, separadamente, para cada um dos tratamentos, ajustado o

seu pH para 7,9 antes da autoclavagem e tamponado com 5 mM de MOPS (pH 7,9) após o resfriamento, a fim de evitar alterações do pH durante o experimento. O pH foi medido no início e no final do experimento.

Tubos de ensaio contendo 10 ml de meio AA/4 foram inoculados com 100 μ l de cultura pura de cianobactérias, obtidas através da mesma metodologia utilizada em experimentos anteriores. Esses, após serem vedados, foram colocados em suportes inclinados, em câmaras de crescimento, sob as mesmas condições descritas no experimento anterior, durante um período de 7 dias. A seguir, foram feitas avaliações do crescimento das cianobactérias através da variação do conteúdo de clorofila *a*.

O efeito de concentrações decrescentes de P sobre a formação de acinetos foi avaliada através da contagem destas células em hemacitômetro, para todos os tratamentos, ao final do experimento.

Para estudar o efeito da concentração molar de fósforo (P) sobre o crescimento das cianobactérias usou-se um modelo de regressão do tipo:

$$Y = ax^b, \text{ onde:}$$

Y = produção de biomassa, expressa pelo conteúdo de clorofila a ;

a = constante de integração;

X = nível da concentração de fósforo (P);

b = taxa de acúmulo de biomassa.

2.3. Efeito da temperatura sobre a fixação biológica do nitrogênio em cianobactérias

Para estimar a fixação biológica do nitrogênio nas espécies estudadas foi medida a atividade da nitrogenase, através do método de redução do acetileno em etileno (HARDY *et alii*, 1968).

Inicialmente, culturas axênicas de cianobactéria foram crescidas durante 10 dias em câmaras de crescimento sob condições fotoautotróficas nas temperaturas de 20°C, 25°C e 35°C. As culturas foram mantidas em frascos Erlenmeyer sob agitação constante de 110 rpm, contendo meio líquido AA/4 isento de nitrogênio combinado. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento (10^8 a 10^9 células/ml em 50 ml), o conteúdo dos frascos foi homogeneizado por meio de fortes fluxos feitos com uma seringa estéril. Um volume de 2,5 ml foi transferido para os frascos de reação (5.0 ml de

capacidade e 20 mm de diâmetro) os quais foram hermeticamente vedados com tampa de borracha.

Quadruplicatas de cada espécie foram preparadas e incubadas nas referidas temperaturas. No tempo igual a zero, foi injetado 5% (V/V) de gás acetileno, previamente gerado em laboratório, através da seguinte reação:

Os frascos foram agitados manualmente e 100 µl de amostra da fase gasosa foram coletados para análise. Posteriormente, em intervalos de 15 e 30 minutos, após a injeção do acetileno, novas amostras da fase gasosa foram coletadas e analisadas. Etileno e acetileno foram quantificados em um cromatógrafo a gás através de uma coluna PORAPAK R Modelo 940, com detector de chama ionizante (Variant Associates, Palo Alto, Cal., USA). As taxas de etileno produzido foram expressas em nanomoles de etileno por minuto por µg de clor.

Após concluídas essas análises, o conteúdo dos frascos de reação (2,5 ml) foram utilizados para contagem de heterocistos e medidas de biomassa, através do conteúdo de clorofila *a*.

Para o estudo dos efeitos da temperatura sobre a fixação biológica de nitrogênio pela atividade da nitrogenase usou-se um delinamento composto de 5 tratamentos, isto é, cada espécie de cianobactéria estudada é um tratamento, e 4 repetições.

A comparação entre as médias dos tratamentos foram feitas pelo teste de Newman Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

2.4. Isolamento de mutantes espontâneos em cianobactérias

A seleção de mutantes espontâneos de cianobactérias foi feito a partir de inóculo puro do tipo selvagem. Esses cresceram na presença e na ausência dos análogos L-metionina-DL-sulfoximina (MSX - Sigma Chemical Co.), um inibidor irreversível da enzima glutamina sintetase; 5'-fluorocitosina (5FC - Sigma Chemical Co.), um análogo à base pirimidínica (citosina) que promove a inativação da enzima citosina diaminase; e 5'-fluorouracil (5FU - Sigma Chemical Co.), também análogo de base pirimidínica que interfere no metabolismo de nucleotídeos reduzindo as taxas de processos biossintéticos e o crescimento.

O meio basal utilizado para os mutantes foi preparado, separadamente, para cada um dos análogos com as seguintes concentrações finais: 50 μ M de MSX, 40 μ g/ml de 5FC e 40 μ g/ml de 5FU. Esse meio foi sempre suplementado com 2,5 mM de NH_4Cl e tamponado com 5 mM de MOPS, ambos ajustado o pH para 7,9 com NaOH.

O inóculo foi preparado usando-se extrato de células puras (50 ml) contendo 1×10^{10} células. Essas foram centrifugadas a 1000 Xg (10 minutos) e o sedimento foi ressuspendido em 2 ml de meio AA/4 e fortemente agitado. Aliquotas de 500 μ l foram retiradas, estriadas em placas contendo meio sólido mais o análogo e incubadas em condições fotoautotróficas por aproximadamente 30 dias. As colônias sobreviventes foram retiradas das placas e transferidas para novo meio de cultura sólido de composição idêntica ao primeiro. Eram novamente incubadas, nas mesmas condições anteriores, por cerca de 10 dias. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes em todos os casos.

As colônias sobreviventes foram investigadas para resistência, sendo repicadas em meio sólido contendo o análogo juntamente com o tipo selvagem (10 placas), no mínimo 6 vezes, repetindo-se os mesmos procedimentos acima citados. Somente para o análogo MSX

foram usados, para esse teste, concentrações crescentes e iguais a 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M de MSX, além do controle (sem MSX ao meio).

A caracterização do possível mutante foi testada para o 5FC, através do crescimento deste em meio contendo outro análogo, o 5'-fluorouracil (5FU), utilizando-se a metodologia descrita por CHAPMAN & MEEKS (1987). Comprovada a mutação através do crescimento de 50% das colônias de mutantes neste novo meio, os clones de mutantes estavam prontos para serem transferidos para meio AA/4 líquido. Desta forma, eram produzidos os inóculos para utilização em experimentos posteriores.

A manutenção dos mutantes de cianobactérias foi feita de duas maneiras: a primeira, em meio líquido e agitação constante (110 rpm), e a segunda, em meio solidificado com 1,2% (P/V) de agar purificado. Em ambos, o meio podia conter ou não suplemento de nitrogênio combinado e as culturas foram mantidas em condições fotoautotróficas.

A fim de estimar a fixação biológica de nitrogênio, através do método de redução de acetileno, os mutantes selecionados foram transferidos para meio líquido AA/4 isento de nitrogênio, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente no item 2.3 e mantendo-se a temperatura a 25°C.

Avaliou-se, estatisticamente, o crescimento de mutantes espontâneos de cianobactérias, em presença ou ausência das substâncias análogas, utilizando-se o modelo logístico expresso pela equação:

$$Y = \frac{A}{(1+be^{-kT})};$$

em que os parâmetros da regressão são idênticos aos descritos no item 2.2.1.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento das cianobactérias

O meio mineral BG-11, líquido ou sólido, proporcionou um bom substrato para o crescimento e isolamento das formas filamentosas e heterocistadas de cianobactérias.

O isolamento dos organismos pela técnica de diluição em série, seguida de repicagens sucessivas, mostrou ser muito eficiente. Entretanto, tais técnicas exigem muito trabalho, paciência e um exame diário das placas sob microscópio estereoscópico.

Foram isolados cinco gêneros diferentes de cianobactérias, quatro pertencentes a Ordem Nostocales, com representantes das Famílias Nostocaceae (*Anabaena*, *Cylindrospermum* e *Nostoc*) e Rivulariaceae (*Calothrix*), e apenas um representante da Ordem Stigonematales da Família Stigonemataceae (*Westiellopsis*) (DESIKACHARY, 1959).

3.2. Purificação das cianobactérias

Os gêneros de cianobactérias purificadas são mostrados na Tabela 3.

A associação das técnicas de fragmentação de filamentos seguida de repicagens sucessivas revelou ser um instrumento importante e eficiente na obtenção de culturas axênicas e de clones de cianobactérias.

Constatou-se que, com o uso destas técnicas era possível obter culturas axênicas e clonadas com menos de 30 dias, após o início dos trabalhos.

A uniformidade genotípica, obtida a partir do crescimento de uma única célula ou filamentos curtos (2 a 4 células) como fonte da população clonal, foi a grande vantagem observada pela utilização dessas técnicas. Entretanto, paciência, persistência, disponibilidade de tempo e constantes exames macro e microscópicos, são exigidas para o seu sucesso.

3.3. Seleção das espécies

A avaliação do crescimento das cianobactérias foi inicialmente visual, pois produzir biomassa, no menor intervalo de tempo, foi o primeiro critério adotado. A eficiência de plaqueamento (EP), os

Tabela - 3. Cianobactérias purificadas.

VARZEA AMAZÔNICA (AM)	VALE DO PARAÍBA (P)
<i>Westiellopsis yengarii</i> (AM1a)	<i>Calothrix</i> sp (P65a)
<i>Nostoc</i> sp (AM1c)	<i>Nostoc</i> sp (P83a)
<i>Nostoc</i> sp (AM50e)	<i>Nostoc muscorum</i> (P162a)
<i>Nostoc punctiforme</i> (AM91a)	<i>Nostoc commune</i> (P168a)
<i>Nostoc</i> sp (AM105a)	<i>Cylindrospermum</i> sp (P174a)
<i>Nostoc</i> sp (AM112b)	
<i>Nostoc</i> sp (AM113c)	
<i>Nostoc</i> sp (AM173c)	
<i>Nostoc</i> sp (AM228b)	
<i>Nostoc</i> sp (43)	
<i>Anabaena</i> sp (AM4c)	

dados de c.f.u. e o conteúdo de clorofila *a*, foram os outros critérios adotados na seleção das espécies, cujos dados constam na Tabela 4

Foram escolhidas as seguintes espécies de cianobactérias:

-*Westiellopsis yengarii* (AM1a)

-*Nostoc punctiforme* (AM91a)

-*Nostoc muscorum* (P162a)

-*Nostoc commune* (P168a), as quais apresentaram um crescimento mais rápido e que por essa razão, foram as primeiras a serem clonadas.

A Tabela 4 mostra uma superioridade na EP, c.f.u e conteúdo de clorofila *a*, para *Nostoc* (43) sobre as demais. Entretanto, esta taxa de crescimento elevada, obtida em 8 dias, somente foi observada enquanto o organismo cresceu em meio suplementado com nitrogênio combinado, razão pela qual a mesma não foi selecionada. Quando crescido em meio AA/4 líquido, isento de fonte de nitrogênio combinado, *Nostoc* (43) apresentou um crescimento lento. É importante ressaltar que esta mesma espécie foi a mais difícil de ser purificada devido a espessa bainha mucilaginosa que produzia.

Com exceção de *Nostoc* (43), as outras espécies apresentaram valores de EP mais baixos e os valores obtidos para a clorofila *a* foram variáveis entre as espécies.

Tabela - 4. Dados da eficiência de plaqueamento, unidade formadora de colônia e conteúdo de clorofila *a* nos gêneros purificados.

GÊNEROS	EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO (EP)	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (c.f.u/ml)	CONTEÚDO DE CLOROFILA <i>a</i> ($\mu\text{gCl}a/\text{ml}$)
<i>Nostoc</i> (43)	120	$15,3 \times 10^6$	12,1
<i>Nostoc</i> (AM91a)*	52	$9,5 \times 10^6$	6,7*
<i>Nostoc</i> (P162a)*	52	$13,8 \times 10^6$	7,7*
<i>Nostoc</i> (AM228b)	42	$11,5 \times 10^6$	1,5
<i>Nostoc</i> (P83a)	41	$1,0 \times 10^6$	2,6
<i>Westiellopsis</i> (AM1a)*	31	$2,2 \times 10^6$	5,2*
<i>Nostoc</i> (AM112b)	30	$10,4 \times 10^6$	1,1
<i>Nostoc</i> (P168a)*	29	$2,0 \times 10^6$	6,7*
<i>Calothrix</i> (P65a)	29	$1,7 \times 10^6$	4,0
<i>Nostoc</i> (AM113c)	24	$6,4 \times 10^6$	4,9
<i>Nostoc</i> (AM173a)	19	$1,7 \times 10^6$	3,9
<i>Nostoc</i> (AM50e)	12	$5,3 \times 10^6$	7,2
<i>Nostoc</i> (AM1c)	10	$9,2 \times 10^6$	5,1
<i>Anabaena</i> (AM4c)	6	$3,4 \times 10^6$	6,8
<i>Cylindrospermum</i> (P174a)	3	$3,4 \times 10^6$	3,9

(*) - espécies selecionadas para a realização deste trabalho

Das quatro espécies selecionadas *Westiellopsis yengarii* (AM1a) e *Nostoc commune* (P168a) foram aquelas que apresentaram os valores mais baixos de EP e c.f.u., mas quanto ao conteúdo de clorofila *a*, os valores não chegaram a diferir significativamente das espécies de *Nostoc punctiforme* (AM91a) e *Nostoc muscorum* (P162a).

O critério visual, inicialmente adotado, foi posteriormente confirmado pelo conteúdo de clorofila *a*, que revelou ser a metodologia mais eficiente na indicação de produção de biomassa. As espécies escolhidas cresceram rapidamente (10 dias) em meio líquido isento de nitrogênio combinado fornecendo biomassa suficiente para o prosseguimento dos trabalhos.

Por outro lado, os dados de eficiência de plaqueamento e contagem de c.f.u. não proporcionaram uma boa indicação para verificar a produção de biomassa e seleção das espécies. Entretanto, tais metodologias podem ser úteis em teste de espécies mutantes de cianobactérias a serem utilizadas como inóculo.

3.4. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias

As variações do crescimento das

cianobactérias em função da temperatura de incubação são mostradas na Figura 1.

Para a temperatura de 20°C, os valores mais elevados de produção de biomassa (conteúdo de cl α) foram observados para as espécies de *Nostoc sp* (ATCC 29133), *Nostoc punctiforme* (AM91a) e *Hestiellopsis yengarii* (AM1a), respectivamente. À temperatura de 25°C, as espécies *H. yengarii* e *Nostoc sp* apresentaram maior intensidade de crescimento do que as demais, enquanto que a 35°C, *H. yengarii*, *N. punctiforme* e *N. commune* (P168a) superaram as demais espécies. Estas observações podem ser confirmadas através dos valores de A e K apresentados na Tabela 5.

N. muscorum (P162a) foi a espécie mais susceptível às mudanças de temperatura, apresentando os menores valores de produção de biomassa nas temperaturas estudadas e os menores valores de A, K e R^2 (Tabela 5).

As fases do crescimento das cianobactérias descritas graficamente na Figuras 1 foram distintas para quase todas as espécies, com exceção de *N. muscorum*, que não apresentou a fase lag. Para a maioria das espécies a fase teve curta duração, de aproximadamente 2 dias, enquanto que, para *H. yengarii* este tempo dobrou (4 dias).

A fase log ou de crescimento exponencial foi a mais pronunciada com um tempo de duração que variou

FIGURA 1 - Variação do crescimento de cianobactérias ($\mu\text{g Cl}_2/\text{ml}$) em função do tempo de incubação (6 dias).

Tabela - 5. Análise do crescimento de cianobactérias obtido em diferentes temperaturas de incubação.

ESPÉCIE	TEMPERATURA INCUBAÇÃO (°C)	A	b	K	R ²
<i>Westiellopsis</i>	20	4,7632	60,6460	0,0264	0,98
<i>yengarii</i>	25	21,0589	685,8466	0,3955	0,97
(AM1a)	35	16,9601	5000,000	0,0557	0,93
<i>Nostoc</i>	20	5,0983	74,5706	0,0360	0,96
<i>punctiforme</i>	25	7,7853	49,7076	0,0516	0,89
(AM91a)	35	8,2151	20,4500	0,0359	0,86
<i>Nostoc</i>	20	3,5297	2,0906	0,0176	0,31
<i>muscorum</i>	25	4,7724	1,4236	0,0471	0,51
(P162a)	35	4,0683	1,1849	0,0355	0,42
<i>Nostoc</i>	20	4,4748	84,7406	0,0336	0,93
<i>commune</i>	25	7,8327	249,1977	0,0441	0,86
(P168a)	35	7,0606	3275,460	0,0711	0,63
<i>Nostoc sp</i>	20	7,2847	5000,000	0,0643	0,99
(ATCC 29133)	25	14,6170	5000,000	0,0573	0,99
	35	4,7191	1311,001	0,0584	0,98

A equação utilizada na definição dos parâmetros A, b e K:

$$Y = \frac{A}{(1 + be^{-kT})}; \text{ onde: } A = \mu\text{gCl}\alpha/\text{ml} \text{ e } K = \mu\text{gCl}\alpha/\text{ml/h.}$$

Tabela - 6. Valores médios de tempo de geração (TG) para diferentes temperaturas de incubação.

ESPÉCIE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE GERAÇÃO (h)
<i>Hestiellopsis</i>	20	28
<i>yengarii</i>	25	20
(AM1a)	35	30
<i>Nostoc</i>	20	25
<i>punctiforme</i>	25	30
(AM91a)	35	28
<i>Nostoc</i>	20	60
<i>muscorum</i>	25	40
(P162a)	35	57
<i>Nostoc</i>	20	40
<i>commune</i>	25	40
(P168a)	35	40
<i>Nostoc sp</i>	20	14
(ATCC 29133)	25	30
	35	20

entre 6 a 8 dias, nas diferentes temperaturas para *W. yengarii*, *N. punctiforme*, *N. commune* e *Nostoc sp*, enquanto que para *N. muscorum* foi uma fase que durou 4 dias nas temperaturas de 25° e 35°C e 8 dias para a temperatura de 20°C. Nessa fase foram calculados, para cada uma das espécies de cianobactéria e temperaturas testadas, os valores médios do tempo de geração, os quais estão apresentados na Tabela 6. Estes valores foram muito variáveis e mostraram que *Nostoc sp* foi a cianobactéria mais eficiente em dobrar a população à 20°C; *W. yengarii* a 25°C, e a 35°C, novamente, *Nostoc sp*.

A fase estacionária foi observada entre o 6° e 8° dias do experimento para todas as espécies, exceto para *N. muscorum*. Nessa fase, foram observadas alterações nas colorações das culturas (verde-azulado/verde-amarelado) como ocorreu para *W. yengarii*; *N. muscorum*; *N. commune* à 20°C e *Nostoc sp* à 35°C.

3.5. Efeito do pH sobre o crescimento das cianobactérias

A influência do pH sobre o crescimento das cianobactérias, em função do tempo, foi observado graficamente como mostra a Figura 2.

Os teores mais elevados de conteúdo de

FIGURA 2 - Efeito do pH sobre o crescimento de cianobactérias ($\mu\text{gClg/ml}$) em função do tempo de incubação (6 dias).

clorofila *a* foram, de modo geral, obtidos para os valores de pH iguais a 7,0 e 7,9. Os menores valores foram registrados para o pH igual a 5,5.

O parâmetro tempo pode ser considerado, para todas as espécies, como um fator importante na resposta das mesmas aos diferentes valores de pH. As variações da biomassa ocorreram tanto em função do tempo, como em função dos diferentes valores de pH analisados.

Nostoc (ATCC 29133) apresentou uma queda no crescimento ao nível de pH 5,5, revelando uma sensibilidade maior do que as outras espécies para crescer em pH ácido.

Comparando os resultados obtidos na Figura 2, com os valores de pH dos solos amostrados, (Tabela 2) observa-se que as espécies isoladas no solo de várzea (Amazônia) produziram menos biomassa em pH baixo (5,5 e 6,5) do que as espécies isoladas nos tabuleiros de arroz irrigado.

O crescimento observado para *Nostoc commune* (P168a), ao longo do período experimental, foi independente dos diferentes valores de pH estudados. A espécie mostrou alterações no crescimento em função do tempo e parece ser um organismo fácil de adaptar a todos os níveis de pH analisados.

O pH dos meios de cultura não foram

alterados, ao final do período amostral, constatando-se a eficiência dos tampões MOPS e MES utilizados no experimento.

3.6. Efeito da concentração de sal sobre o crescimento das cianobactérias

O efeito da concentração de sal (0,1 e 0,2 M de NaCl) sobre o crescimento das cianobactérias bem como sua produção de acinetos estão apresentados na Tabela 7.

A produção de biomassa, refletida graficamente na Figura 3, mostrou as modificações decorrentes do estresse de sal. Pôde ser observado que o crescimento decresceu, consideravelmente, à medida em que as concentrações de sal foram aumentadas.

Uma comparação gráfica torna evidente o comportamento inverso apresentado pelas espécies de cianobactérias em termos de produção de biomassa e de produção de acinetos, nas referidas concentrações molares do sal.

Na concentração de NaCl igual a 0,1 M o crescimento ou a tolerância ao estresse salino, foi praticamente o mesmo para todas as espécies, exceto para *Nostoc sp* (ATCC 29133) que mostrou um decréscimo mais acentuado. *Nostoc muscoorum* foi a espécie mais tolerante a

Tabela - 7. Análise do crescimento de cianobactérias e produção de acinetos em diferentes concentrações de NaCl, à temperatura de 25°C, durante 7 dias.

ESPÉCIES	NaCl (M)	$\bar{X}$ ($\mu\text{gCl}_a/\text{ml}$)	Nº RELATIVO DE ACINETOS
<i>Westiellopsis</i>	0,0	2,195 ^A	54,6
<i>yengarii</i>	0,1	1,285 ^B	197,9
(AM1a)	0,2	0,165 ^C	320,9
<i>Nostoc</i>	0,0	3,780 ^A	43,2
<i>punctiforme</i>	0,1	1,372 ^B	148,1
(AM91a)	0,2	0,430 ^C	406,3
<i>Nostoc</i>	0,0	1,960 ^A	56,5
<i>muscorum</i>	0,1	1,355 ^B	109,3
(P162a)	0,2	0,722 ^C	527,8
<i>Nostoc</i>	0,0	3,530 ^A	59,6
<i>commune</i>	0,1	1,497 ^B	227,3
(P168a)	0,2	0,162 ^C	505,6
<i>Nostoc sp</i>	0,0	2,737 ^A	44,6
(ATCC 29133)	0,1	0,820 ^B	174,0
	0,2	0,082 ^C	605,8

As médias seguidas de letras diferentes diferem-se ao nível de 5%, pelo teste de Newman Keuls.

FIGURA 3 - Crescimento médio das cianobactérias em meio de cultura AA/4 contendo diferentes concentrações molares de NaCl.

A → *W. yengarii*

D → *N. commune*

B → *N. punctiforme*

E → *Nostoc* sp.

C → *N. muscorum*

concentração de 0,2 M de NaCl comparadas as demais e *Nostoc sp* (ATCC 29133) foi a mais sensível.

As culturas foram observadas visualmente e microscopicamente ao longo do período experimental e constatarem-se alterações na coloração das mesmas que variaram de verde-azulado a amarelo-claro. *Nostoc sp* apresentou uma coloração praticamente incolor ao final do experimento.

O número relativo de acinetos produzidos pelas cianobactérias para os tratamentos 0,0; 0,1 e 0,2 M de NaCl foi observado microscopicamente, constatando-se um aumento crescente entre os tratamentos controle e os demais tratamentos, o que sugere uma resposta positiva dos organismos diante das alterações do meio.

O pH do meio de cultura, onde cresceram as cianobactérias, com concentrações crescentes de sal durante 7 dias, não apresentou alterações quando medido ao final do experimento.

3.7. Deficiência de fósforo sobre o crescimento das cianobactérias

As variações no crescimento das cianobactérias em função de diferentes concentrações molares de fósforo (P), estão apresentadas na Figura 4. A

FIGURA 4 - Produção média de biomassa ($\mu\text{gClq/ml}$) por cianobactérias de vida livre, em função de diferentes concentrações molares de fósforo (0,1=0,02 μM ; 1=0,2 μM ; 10=2 μM ; 50=3 μM ; 100=40 μM)

Tabela 8 apresenta os valores médios de produção de biomassa bem como a produção de acinetos pelas cianobactérias nos diferentes tratamentos com fósforo.

Todas as espécies de cianobactérias responderam positivamente às concentrações máximas de fósforo ($40 \mu\text{M}$ de P) e tiveram um crescimento limitado em concentrações mínimas ($0,02 \mu\text{M}$ de P) no meio de cultura.

Constatou-se que, dentre as espécies estudadas *N. muscorum* revelou ser a espécie que produziu mais biomassa frente aos extremos de concentração de fósforo ($40 \mu\text{M}$ e $0,02 \mu\text{M}$). Isso sugere que esta espécie deva ser mais tolerante que as demais a baixas concentrações de fósforo do meio.

Nostoc punctiforme e *N. commune* foram as espécies mais susceptíveis aos efeitos do fósforo sobre o crescimento, pois registrou as menores taxas de produção de biomassa durante o decorrer do experimento.

O padrão de crescimento observado entre as espécies mostrou ser muito uniforme, com a taxa de crescimento diminuindo expressivamente a partir de concentrações de fósforo igual a $3 \mu\text{M}$ de P.

Observou-se, ao final do período experimental que, embora crescendo em meio contendo apenas $0,02 \mu\text{M}$ de P, todas as espécies apresentaram crescimento, entretando, *Nostoc muscorum*, comparativamente, apresentou

Tabela - 8. Análise do crescimento de cianobactérias ($\mu\text{gCl}_a/\text{ml}$) e produção de acinetos em diferentes níveis de fósforo (μM), à temperatura de 25°C .

ESPÉCIE	P(μM)	$\bar{X}$ ($\mu\text{gCl}_a/\text{ml}$)	Nº RELATIVO DE ACINETOS
<i>Hestiellopsis yengarii</i> (AM1a)	40	5,08	54,5
	3	3,81	191,0
	2	3,45	232,6
	0,2	2,56	325,5
	0,02	1,88	*
<i>Nostoc punctiforme</i> (AM91a)	40	2,35	43,2
	3	1,68	186,9
	2	1,06	252,1
	0,2	1,00	436,1
	0,02	0,68	*
<i>Nostoc muscorum</i> (P162a)	40	2,65	56,5
	3	2,28	60,7
	2	1,86	83,9
	0,2	1,59	147,1
	0,02	1,25	*
<i>Nostoc commune</i> (P168a)	40	3,40	59,6
	3	2,79	58,2
	2	1,85	195,7
	0,2	1,59	297,1
	0,02	0,94	*
<i>Nostoc sp</i> (ATCC 29133)	40	3,25	44,6
	3	2,74	108,6
	2	2,38	184,6
	0,2	2,11	361,8
	0,02	1,21	*

(*) - Dados não amostrados

taxas mais elevadas, acompanhada por um número menor de acinetos e uma coloração verde mais intensa.

Observou-se aumentos crescentes no número de acinetos produzidos pelas cianobactérias, nas diferentes concentrações de fósforo. Isso parece estar relacionado a uma resposta positiva do organismo à deficiência de fósforo no meio (Tabela 8).

O pH do meio de cultura onde cresceram as cianobactérias não apresentou alterações durante o período amostral, confirmando a eficiência do tampão utilizado.

3.8. Efeito da temperatura sobre a fixação biológica do nitrogênio

A Tabela 9 mostra os valores médios expressos em nmol de etileno produzido/ $\mu\text{gCl}_2 \cdot \text{min}^{-1}$, em culturas de cianobactérias crescidas às temperaturas de 20, 25 e 35°C.

Foi observado que a produção de etileno pelas espécies estudadas foi pequena nas condições em que foram conduzidos os experimentos.

Os resultados obtidos através da análise estatística revelaram uma atividade mais expressiva da enzima nitrogenase em *Nostoc sp* à 20°C, em *Nostoc muscorum* à 25°C e em *Nostoc commune* à 35°C.

Tabela - 9. Comparações entre os valores médios de produção de etileno ($\text{nmol C}_2\text{H}_4/\mu\text{gCl}_a.\text{min}^{-1}$) e o número relativo de heterocistos em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) por cianobactéria.

ESPÉCIE	$^{\circ}\text{C}$	$\bar{X}$ $\text{nmolC}_2\text{H}_4/\mu\text{gCl}_a.\text{min}$	N ^o RELATIVO DE HETEROCISTOS
<i>Westiellopsis yengarii</i>	20	1,332 ^B	11,3
	25	3,620 ^A	43,1
	35	1,430 ^B	13,3
<i>Nostoc punctiforme</i>	20	1,680 ^C	14,6
	25	3,820 ^A	65,4
	35	2,533 ^B	25,1
<i>Nostoc muscorum</i>	20	3,116 ^B	30,6
	25	4,873 ^A	58,9
	35	2,910 ^B	12,9
<i>Nostoc commune</i>	20	1,060 ^C	8,4
	25	2,850 ^B	40,6
	35	4,222 ^A	51,3
<i>Nostoc sp</i>	20	4,430 ^A	74,3
	25	2,140 ^B	48,6
	35	0,885 ^C	13,4

As médias seguidas de letras diferentes diferem-se ao nível de 5%, pelo teste de Newman Keuls.

O aumento registrado na frequência de heterocistos acompanhou os aumentos da temperatura à 20° e à 25°C, entretanto, à 35°C houve uma tendência à diminuição exceto para *Nostoc commune*. *Nostoc sp* apresentou a menor taxa de atividade enzimática à temperatura de 35°C, um resultado esperado para essa espécie de clima temperado.

3.9. Mutantes espontâneos em cianobactérias

As curvas de crescimento descritas pelos mutantes espontâneos de *Nostoc punctiforme* e *Nostoc muscorum*, bem como para os tipos selvagens, estão apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Na Tabela 10, encontram-se os parâmetros utilizados na análise estatística do crescimento desses mutantes. Os fenótipos dos mutantes espontâneos obtidos em meios de cultura contendo o análogo MSX ou 5FC estão apresentados na Tabela 11.

O possível mutante de *N. punctiforme* resistente ao análogo L-Metionina-DL-Sulfoximina - MSX - mostrou uma taxa de crescimento muito semelhante quando foram cultivados na presença ou ausência de 50 µM de MSX. Quando comparadas as taxas de produção de biomassa entre as curvas de A (-MSX) e B (selvagem) (Figura 5), obtidas

em meio AA/4 isento de N combinado e MSX, constatou-se que o tipo selvagem produziu uma taxa de biomassa duas vezes maior ($7,5 \mu\text{gCl}_2.\text{ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$) do que o possível mutante ($3,2 \mu\text{gCl}_2.\text{ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

O mutante espontâneo ($+\text{MSX}^R$), durante o seu ciclo de crescimento apresentou uma fase de crescimento exponencial longa (A), que teve duração de cerca de 10 dias, em contraposição à curva característica de crescimento descrita pelo tipo selvagem (B), que durou apenas 5 dias.

O tempo necessário para que o possível mutante ($+\text{MSX}^R$) pudesse dobrar sua população, "doubling time" foi igual a 16 horas, enquanto que o tipo selvagem, nas mesmas condições de crescimento, demorou cerca de 30 horas, isto é, aproximadamente o dobro do tempo gasto pelo possível mutante.

Possíveis mutantes espontâneos ($+\text{MSX}^R$), quando crescidos juntamente com o tipo selvagem, em meio contendo $5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e controle (sem MSX), apresentaram crescimento de colônias em todas as placas, ao passo que o tipo selvagem em todas as concentrações do análogo, foi totalmente inibido quanto ao crescimento.

Observações a olho nu e também em microscópio estereoscópico revelaram a existência de dois tipos morfológicos de colônias, crescidas em meio

sólido, para o possível mutante. Colônias pequenas e colônias grandes foram obtidas a partir dos sobreviventes crescidos em meio contendo 50 μ M do análogo MSX. O aparecimento de dois tipos morfológicos de colônias sugere uma possível alteração no mecanismo de transporte do análogo MSX atuando nas células do organismo.

O possível mutante de *N. muscorum* (+5FC), resistente ao análogo 5FC, também apresentou curvas de crescimento bem distintas àquelas descritas pelo tipo selvagem, conforme mostra a Figura 6 (A e B).

Uma taxa de crescimento mais elevada, seguida por uma fase lag mais longa foi observada quando o possível mutante cresceu em meio de cultura na ausência do análogo 5FC (Figura 6A). O resultado dessa curva foi, então, o oposto aquele descrito pela curva da Figura 5A para o análogo MSX.

O tipo selvagem de *N. muscorum* registrou taxas de crescimento mais elevadas do que o possível mutante (+5FC^R) crescido tanto na presença quanto na ausência do análogo, Figura 6 (A e B).

Num tempo de geração próximo de 16 horas, o possível mutante revelou sua potencialidade para crescer e dobrar a população, em menor intervalo de tempo do que o tipo selvagem, visto que o tipo selvagem, nas mesmas condições de crescimento, demorou cerca de 40 horas para

dobrar a população.

Não foram observadas quaisquer alterações morfológicas entre as colônias dos dois tipos estudados: +5FC^R e selvagem, durante o período amostrado, quanto ao tamanho ou coloração diferente das colônias produzidas.

O crescimento do tipo selvagem, juntamente com o possível mutante (+5FC^R), em meio suplementado com 40 µg/ml de 5FC, teve o seu crescimento totalmente inibido.

Cerca de sessenta colônias de possíveis mutantes resistentes ao 5FC foram escolhidas casualmente e plaqueadas, em duas placas de Petri (30 colônias por placa), contendo meio AA suplementado com 40 µg/ml do análogo 5FU. Após 15 dias de crescimento foram contadas as colônias viáveis das duas placas. Constatou-se que cerca de 50% das colônias de cada placa permaneceram viáveis, isto é, resistentes ao 5FU. Este resultado permitiu caracterizar e comprovar a existência do mutante espontâneo de 5FC.

Os resultados da atividade da enzima nitrogenase, pelo método de redução de acetileno, revelaram que tanto os mutantes resistentes ao MSX quanto ao 5FC fixaram o N₂ de maneira mais eficiente do que os respectivos tipos selvagens. Associada a essa taxa mais elevada de fixação de N₂, também, o número de heterocistos

diferenciados aumentou, numa proporção de 18% (entre mutante MSX e selvagem), e de 28% (entre mutante 5FC^R) e selvagem, Tabela 12.

FIGURA 5 - Curvas de crescimento ($\mu\text{gClg/ml}$) descritas por *Nostoc punctiforme* em meio AA/4, isento de nitrogênio: A - possível mutante na presença (+MSX) e na ausência (-MSX) do análogo L-glutamato (MSX); B - tipo selvagem .

FIGURA 6 - Curvas de crescimento ($\mu\text{gClg/ml}$) descrita por *Nostoc muscorum* em meio AA/4, isento de nitrogênio: A - possível mutante na presença (+5FC) e na ausência (-5FC) do análogo da citosina (5FC); B - tipo selvagem.

Tabela - 10. Análise do crescimento de mutantes espontâneos de cianobactérias à temperatura de 25°C.

ESPÉCIE	MSX	5FC	PARAMETROS DA REGRESSÃO			
			A	b	k	R ²
<i>Nostoc</i>	+MSX ^R		3,5345	35,8380	0,0241	0,98
<i>punctiforme</i>	-MSX		3,2250	81,5650	0,0215	0,96
(AM91a)						
<i>Nostoc</i>		+5FC ^R	1,3728	17,9425	0,0280	0,79
<i>muscorum</i>		-5FC	2,0068	16,8008	0,0285	0,97
(P162a)						

Equação utilizada na definição dos parâmetros A, b e k:

$$Y = \frac{A}{(1+be^{-kt})} ; \text{ onde:}$$

$$A = \mu\text{gCl}\alpha.\text{ml}^{-1}$$

$$K = \mu\text{gCl}\alpha.\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$$

Tabela - 11. Fenótipos dos possíveis mutantes espontâneos obtidos no experimento.

ESPÉCIE	RESISTÊNCIA ^(a)	
	+MSX ^R	+5FC ^R
<i>N. punctiforme</i> selvagem	s	s
<i>N. punctiforme</i> MSX ^R	r	s
<i>N. muscorum</i> selvagem	s	s
<i>N. muscorum</i> 5FC ^R	s	r

(a): A resistência foi medida através da ocorrência de crescimento (r) ou não crescimento (s) em meio sólido contendo o análogo, às concentrações de 50 μ M de metionina sulfoximina (MSX) e 40 μ g/ml de 5-fluorocitosina (5FC).

TABELA - 12. Valores médios de produção de etileno (nmol C₂H₄/μgCl₂.min⁻¹) e o número relativo de heterocisto à temperatura de 25°C.

ESPÉCIE	X nmol C ₂ H ₄ /μgCl ₂ .min ⁻¹	N° RELATIVO DE HETEROCISTO
<i>N. punctiforme</i> (selvagem)	3,820 ^A	65,4
<i>N. punctiforme</i> (+MSX ^R)	4,775 ^A	79,8
<i>N. muscorum</i> (selvagem)	4,873 ^A	58,9
<i>N. muscorum</i> (+5FC ^R)	6,961 ^B	82,7

As médias seguidas de letras diferentes diferem-se ao nível de 5%, pelo teste de Newman Keuls.

4. DISCUSSÃO

O meio mineral BG-11, usado como substrato na etapa de isolamento e o meio mineral AA utilizado na purificação e manutenção dos clones axênicos, mesmo apresentando diferenças quanto à composição e concentração de macro e micronutrientes, não diferiram, entretanto, quanto à excelência como meio de cultura para o crescimento das cianobactérias heterocistadas.

Atualmente, os meios BG-11 e AA têm sido largamente utilizados pelos grupos que trabalham com cianobactérias, pois são de grande utilidade no isolamento e purificação de numerosas espécies de diferentes habitats (RIPPKA *et alii*, 1981; ENDERLIN, 1986; JOSEPH, 1986; OTHMAN & WOLLUM II, 1987; PONTES, 1988; STEINBER & MEEKS, 1989; ESTEVES, 1990; e FRIZSTCHE, 1990).

Para ambos, AA e BG-11, a omissão de fontes de nitrogênio combinado nos meios de cultura utilizados se fez necessária a fim de se assegurar a ocorrência da fixação biológica do nitrogênio aerobicamente. RIPPKA *et alii* (1979) observaram que a manutenção prolongada de cianobactérias heterocistadas em

meio contendo nitrogênio pode provocar a seleção de mutantes, os quais perdem a capacidade de fixar nitrogênio aerobicamente, formando heterocistos anormais ou, mais raramente, tornando-se não heterocistadas.

Várias técnicas têm sido propostas como alternativas para isolamento e purificação das cianobactérias (ALLEN & STANIER, 1968; STANIER *et alii*, 1971; WOLK, 1973; RIPPKA *et alii*, 1981; ENDERLIN, 1986; OTHAMAN & WOLLUM, II, 1987; PONTES, 1988; FRITZSCHE & NIEMANN, 1990; FERRIS & HIRSCH, 1991; e SHIRAI *et alii*, 1991). Provavelmente tais alternativas vêm de encontro às inúmeras dificuldades encontradas durante os processos de isolamento e de purificação, que consistem de um árduo trabalho, às vezes, sem resultados positivos.

A escolha e a aplicação, no presente trabalho, da associação das técnicas de fragmentação seguida de repicagens sucessivas foi de extrema utilidade na obtenção das culturas axênicas de cianobactérias. Além de fornecer resultados satisfatórios, num curto intervalo de tempo, é importante enfatizar a sua simplicidade e conveniência na obtenção de clones axênicos.

Esta etapa do trabalho, desenvolvida na Universidade da Califórnia - Davis, requereu o uso de um aparelho de ultra-som, pouco comum nos laboratórios de pesquisas do Brasil. Entretanto, este fato não inviabiliza

a eficiência do método, pois o ultra-som poderá ser, em parte, substituído por seringas, homogeneizadores como bastões de porcelana ou vidro, agitadores magnéticos, etc., que de forma similar promovam o rompimento das colônias em filamentos curtos.

É importante ressaltar que, embora várias técnicas sejam propostas para isolamento e para purificação de cianobactérias, os trabalhos com esses organismos têm sido restritos a uns poucos representantes. É possível que essas técnicas, normalmente utilizadas, possam estar sendo limitantes para um grande número de espécies que poderiam ser isoladas, purificadas e cultivadas, uma vez que, entre as cianobactérias, a diversidade morfológica observada é muito grande, tendo em vista os diversos ambientes em que vivem.

4.1. Efeito da temperatura sobre o crescimento das cianobactérias

A variação do crescimento em função da temperatura de incubação permitiu a descrição de curvas de crescimento, em laboratório, específicas para cada espécie de cianobactéria estudada.

As fases distintas do crescimento (Lag, Log e Estacionária) foram bem marcadas para a maioria das espécies, com exceção de *N. muscorum*. A ausência da fase

lag, observada nas três temperaturas em que cresceu *N. muscorum* ocorreu, provavelmente, em função da idade inadequada do inóculo inicial, utilizado no experimento. Segundo MEEKS & CASTENHOLZ (1971), a fase lag do crescimento de uma cianobactéria torna-se dependente da idade do inóculo e da temperatura anterior em que esse inóculo foi crescido. A fase lag tende a tornar-se ausentequando o inóculo for retirado de culturas crescendo exponencialmente, a mesma temperatura experimental.

As espécies de cianobactérias responderam positivamente às mudanças de temperatura. As taxas de crescimento mais elevadas foram à temperatura de 25°C. Todas as demais espécies apresentaram aumento significativo de produção de biomassa à 25° e 35°C, e alterações foram registradas nos tempos de geração, às três temperaturas (Tabela 6).

Os resultados obtidos para o crescimento em diferentes temperaturas permitem comparar as espécies representantes do solo da várzea amazônica, e dos campos de arroz irrigado, que apresentaram um crescimento médio de 48,4% a mais, à temperatura de 35°C, com a espécie de *Nostoc sp.*, isolada a partir da raiz de *Macrozamia lucida*, e totalmente ajustada ao solo temperado e a baixas temperaturas. Esses resultados também revelaram um crescimento expressivo de *Nostoc sp.* à temperatura de 20°C e uma queda no crescimento à temperatura de 35°C.

Vários autores têm incluído as cianobactérias entre aqueles organismos que exibem uma extensa faixa de tolerância às mudanças de temperatura.

WATANABE & YAMAMOTO (1971) desenvolveram vários estudos em cianobactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos da África, Índia, Japão e Ásia. Os resultados mostraram que os organismos cresceram abundantemente nos trópicos, sendo comum em solos inundados das regiões tropicais e sub-tropicais onde as temperaturas são mais elevadas. Por outro lado, aqueles de solos da região temperada e sub-temperada, onde são registradas temperaturas mais baixas.

ALLEN & STANIER (1968) isolaram algas do solo e de água-doce, utilizando como fator seletivo a temperatura e concluíram que, quando há omissão de fontes de nitrogênio no meio mineral, somente as cianobactérias são capazes de desenvolver às temperaturas de 25° e 35°C. A partir daí, a microflora consistiu, exclusivamente de tipos filamentosos, heterocistadas, sendo posteriormente, eliminados todos os outros grupos de cianobactérias.

STANIER *et alii* (1971) demonstraram que, com exceção das espécies termofílicas, numerosas espécies de cianobactérias mesofílicas mantidas em culturas de laboratório tem crescido satisfatoriamente à temperatura de 25°C; apesar dessa temperatura ainda ser considerada

abaixo da temperatura ótima para organismos mesofílicos. Desta forma, tornou-se prático e conveniente manter culturas líquidas ou em placas a temperatura ambiente. Entretanto, quando se pretende um crescimento mais rápido, esse têm sido obtido à temperaturas mais elevadas, entre 35°-43°C. Tal temperatura, relativamente alta, entretanto, parece ser característica de muitas cianobactérias unicelulares, isoladas de habitats não termais.

A temperatura ótima para o crescimento de cianobactérias é descrita por ROGER & KULASODRIYA (1980) como sendo ao redor de 30 - 35°C. Segundo os autores, a temperatura raramente é um fator limitante ao crescimento desses organismos, principalmente em campos de arroz irrigado; mas interfere tanto na composição da biomassa algal como na produtividade. Em temperaturas elevadas são observados efeitos deletérios nas cianobactérias, bem como na fixação biológica do nitrogênio. Exposições a temperaturas de 42°C durante 50 minutos reduziram a atividade fotossintética de espécies de *Nostoc sp.*

ROGER & REYNAUD (1982) reconheceram que a temperatura ótima para o crescimento das cianobactérias está ao redor de 30-35°C, sendo esta temperatura mais elevada do que a observada para o crescimento das algas eucarióticas. Nos solos irrigados, as variações diárias na temperatura são amenizadas pelo efeito tampão da água de

inundação; este fator impede que a temperatura, raramente, se torne um fator limitante ao crescimento das cianobactérias. Também foi constatado que as mudanças diárias na temperatura são mais drásticas em habitats terrestres do que em ambientes aquáticos.

WHITE et alli (1991) demonstraram o efeito da temperatura sobre a produção de biomassa bacteriana e as taxas de crescimento específico em habitats marinho e de água doce. Foi observado que a biomassa bacteriana apresentava uma interação muito forte com a temperatura, pois à medida que aumentava a biomassa, a temperatura era o fator mais importante que regulava a taxa de crescimento específico.

De modo semelhante, nossos resultados de produção de biomassa em cianobactérias refletiram a mesma tendência observada pelos referidos autores (Tabela 5).

Os dados de temperatura ótima, apresentados pela literatura, também se igualaram aos nossos resultados e variaram entre 20° e 40°C. ALLEN & STANIER (1968) descreveram a temperatura ótima para o crescimento de *N. muscorum* igual a 32,5°C.

WATANABE & YAMAMOTO (1971) mostraram que a temperatura entre 30°-40°C foi ótima para *N. commune*; RIPPKA et alii (1971) encontraram valores de temperatura entre 25°- 30°C, para o crescimento de *Nostoc sp.* (ATCC

-29133), e RAJALAKSHMI (1985) apresentou a temperatura ótima de 37°C para *W. yengarii*.

A temperatura é um importante fator controlador do crescimento das cianobactérias, e isso sugere que valores acima e abaixo da temperatura ótima (25° - 35°C) delimita e seleciona espécies adaptadas a regiões tropicais e temperadas. De maneira geral, os organismos respondem positivamente, às variações da temperatura, podendo também estar associado outros fatores importantes sobre o ecossistema.

4.2 Efeito do pH sobre o crescimento de cianobactérias

As espécies de cianobactérias tiveram seu crescimento alterado em função do pH e do tempo de incubação no qual foram submetidas. O pH ótimo foi estimado estar entre valores de 7,0 e 7,9 (neutro a ligeiramente alcalino).

As espécies da várzea amazônica (pH de origem 5,7-7,1) foram mais sensíveis ao crescimento em pH ácidos (5,5 e 6,5) do que as espécies de solos cultivados com arroz irrigado (pH de origem 3,7-4,0), sendo que *Nostoc commune* apresentou um comportamento atípico crescendo positivamente durante 5 dias, independente do pH do meio. Entretanto, esse crescimento não se manteve até o

final do experimento (Figura 2).

Nostoc sp. (pH de origem desconhecido) apresentou as menores taxas de crescimento, para todos os valores de pH analisados, demonstrando uma elevada sensibilidade.

A produção máxima de biomassa foi registrada pelas cianobactérias, no sexto dia do experimento (último dia de análise) em pH 7,9. Com uma exceção, *N. punctiforme* apresentou um crescimento máximo no quarto dia de mensuração, sendo que, ao final do experimento, esse crescimento diminuiu pela metade.

Foi observado que o pH se destaca como um importante fator limitante afetando a distribuição e a composição da flora algal. Em geral, a acidez é responsável pela composição qualitativa da microflora fotoautotrófica (ROGER & KULASOORIYA, 1980; e ROGER & REYNAUD, 1982). A ocorrência de cianobactérias no solo está preferencialmente ligada às condições neutras e ou alcalinas, sendo frequentemente limitadas em valores de pH inferiores a 6,0 e raras ou ausentes abaixo de 5,0 (FOGG *et alii*, 1973; ROGER & KULASOORIYA, 1980; RIPPKA *et alii*, 1981; ROGER & REYNAUD, 1982). Entretanto, cianobactérias também foram isoladas em diferentes solos do cerrado brasileiro, cujos valores de pH se encontravam a 3,7 e 4,9 (PONTES & SANTOS, 1988). A maior diversidade de

indivíduos, embora tenha sido observada em pH 3,7, não diferiu qualitativamente entre as comunidades algais das duas áreas de estudo.

Cianobactérias, no ambiente natural, crescem preferencialmente em habitats onde o pH varia de neutro a alcalino (pH 7,0-10,0), segundo publicações de RIPPKA *et alii* (1981), HAMDI (1985) e VALIENTE & LEGANES (1989). Esta teoria confirma nossos resultados quando são apresentadas a produção total de biomassa pelas cianobactérias de solo brasileiro em valores de pH estritamente dentro desta faixa.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que *N. muscorum* apresentou a taxa mais elevada de crescimento em pH 7,9; entretanto, ROGER & REYNAUD (1982) e PRASAD & KASHYAP (1990) revelaram a ocorrência de *N. muscorum*, crescendo em solos ácidos, cujos valores de pH variaram entre 5,0-7,0. Esta versatilidade de uma mesma espécie de crescer em solos com valores de pH tão divergentes ficou demonstrada por WATANABE (1973) ser de ocorrência normal em ecossistemas naturais.

4.3. Efeito da concentração de sal sobre o crescimento das cianobactérias

O sal restringe o crescimento dos organismos em ambientes salinos (EPSTEIN, 1975) e, apesar disso, as cianobactérias requerem pequenas quantidades de Na^+ para a fixação de nitrogênio (APTE & THOMAS, 1984), sem contudo acumular o cátion intracelularmente (REDDY *et alii*, 1989).

LEVITT (1980) classificou os organismos vegetais de acordo com sua capacidade para crescer em ambientes salinos como: (a) Halófitas - vegetais que crescem em habitats salinos na presença de altas concentrações de sal sódico. Segundo o autor, as halófitas podem se subdividir em: Halófitas Facultativas ou Halotolerantes, quando crescem em ambientes com baixa ou nenhuma concentração de sal e Halófitas Obrigatórias, quando não podem crescer na ausência de sal; e (b) Glicófitas, os vegetais que não podem crescer em presença do sal.

A partir dos nossos resultados e da classificação apresentada por LEVITT (1980) e HAMDI (1985), as cianobactérias, desse trabalho, comportaram-se semelhantemente à descrição feita para espécies halofíticas facultativas ou halotolerantes, visto que foi

observada uma redução drástica no crescimento de todas as espécies, após decorridos 7 dias de experimentação.

As cianobactérias crescidas em presença de concentrações crescentes de NaCl (0,0; 0,1; 0,2 M) apresentaram crescimento limitado à medida que a concentração do sal foi aumentada (Tabela 7, Figura 3). Os resultados revelaram um crescimento semelhante entre espécies, mas significativamente diferente dentro da mesma espécie. *Nostoc muscorum* mostrou ser a espécie mais tolerante à concentração de 0,2M de NaCl, diminuindo seu crescimento em 63%, quando comparado ao controle, seguida por *N. punctiforme* (88%), *N. yengarii* (92%), *N. commune* (95%) e *Nostoc sp.* (97%). Associado ao monitoriamento feito para o crescimento das cianobactérias, foram feitas observações microscópicas dos filamentos, ao final do período experimental, para determinar a ocorrência ou não de alterações morfológicas das células. Constatou-se que, com o aumento crescente da concentração de sal no meio de cultura, houve um aumento do número de acinetos formados na colônia, comparado ao tratamento controle. Em algumas espécies, como por exemplo em *Nostoc sp.*, este número chegou a alcançar porcentagens elevadas (acima de 1000%). Esse fato, provavelmente, deve estar relacionado a uma resposta positiva dos organismos frente ao estresse salino, acarretando modificações na célula vegetativa em acinetos.

A célula vegetativa ao se diferenciar em acineto sofre modificações morfológicas e bioquímicas, tais como: a perda do pigmento ficocianina, a degradação da clorofila a , a diminuição de β -carotenos, o aumento de xantofilas, etc. Essas alterações, principalmente no conteúdo de pigmentos, levaram a modificações na coloração das colônias.

Segundo JHA *et alii* (1987), concentrações salinas afetam também a frequência de heterocistos. Em *Westiellopsis prolifica*, fixadora de nitrogênio, o crescimento em concentrações salinas de (300 - 400 mM) afetou e ocasionou um aumento na frequência de heterocistos de 40-80% a mais do que o controle, sendo este acompanhado por uma elevada atividade da nitrogenase e um aumento na taxa de fixação de nitrogênio.

Em todas as cianobactérias analisadas, foi observado um crescimento diferencial nas paredes dos frascos de cultura com concentrações de 0,2M de NaCl. Ocorreu a formação de pequenos agregados, como uma massa heterogênea, aderida fortemente às paredes do tubo, sendo necessário o uso de forte agitação em "Vortex" para desprendê-las da parede. Este fato foi também observado em cultura de *Spirulina subsalsa*, uma cianobactéria marinha, crescida em meio hipersalino (água do mar enriquecida com 0,5M de NaCl) conforme informações

de GABBAY & TEL - OR (1985). Neste estudo, observações microscópicas mostraram que a formação de agregados estava associada à concentração de sal do meio, pois em meio hipersalino os filamentos apresentaram-se mais dissociados (formação de pequenos agregados) do que em meio hiposalino. Vários estudos têm procurado explicar as bases bioquímicas e fisiológicas que permitem às cianobactérias sobreviver em ambientes com elevada concentração de sal. A resposta ao estresse salino, nesses organismos, porém, ainda é pouco compreendida (JHA *et alii*, 1987; REDDY *et alii*, 1989).

4.4. Deficiência de fósforo sobre o crescimento das cianobactérias

O comportamento das cianobactérias de solo tropical e temperado, analisadas em relação à deficiência de fósforo (P), mostrou um padrão de crescimento muito semelhante entre si. Houve um decréscimo acentuado nas taxas de biomassa que refletiram a sensibilidade dos organismos quando crescidos em meio deficiente de P.

Nostoc muscorum foi a espécie de cianobactéria que mostrou o menor decréscimo na produção de biomassa (52%), em relação ao controle, após um período de 7 dias. *Westiellopsis yengarii* reduziu em 63% seu

crescimento e teve uma produção mais elevada de biomassa no mesmo período. A redução no crescimento também ocorreu em *Nostoc sp.* sendo igual a de *Westiellopsis* (63%), seguida por *N. punctiforme* (71%) e *N. commune* (72%). Esses resultados sugerem que, *N. muscorum*, tolera de forma mais eficiente a deficiência do nutriente no meio, sendo portanto, uma espécie mais tolerante. Nas condições experimentais, *N. commune* mostrou ser a espécie mais sensível.

Quando comparados, os tratamentos controle, 40 μM de P, e 3 μM de P, com base no crescimento ocorrido dentro da própria espécie, notam-se pequenas diferenças em termos de biomassa produzida, não ultrapassando 28% do crescimento inicial (controle). Este fato mostra que, para estas cianobactérias, as diferenças na taxa de crescimento a 40 μM de P e 3 μM de P foram pouco expressivas. Contrariamente, um decréscimo a partir da concentração de 3 μM foi registrado para as concentrações de 0,2 e 0,02 μM de P.

Têm sido discutido que os requerimentos de fósforo para um crescimento ótimo em cianobactérias diferem consideravelmente entre as espécies, quando os outros fatores externos não são limitantes (ROGER & KULASOODRIYA, 1980). Este fato vem de encontro com os nossos resultados, visto que um crescimento diferenciado foi observado entre as espécies de *Nostoc*.

Observações microscópicas realizadas ao final do período experimental em filamentos de cianobactérias crescidas em diferentes concentrações de P, revelaram um aumento crescente na formação de acinetos pelos filamentos quando comparadas ao controle. É possível que este fato indique uma estratégia a ser utilizada pelas cianobactérias quando expostas às condições adversas do ambiente. *Nostoc muscorum* produziu cerca de 260% mais acinetos que o controle, ao passo que *N. punctiforme* produziu acima de 1000%.

Em cianobactérias, a limitação de P é reconhecida e em *Anabaena cylindrica*, causa um acúmulo de grânulos de cianoficina, grânulos de reserva, quando a alga está crescendo em concentrações acima de 100 μ M de P no meio de cultura (PETERSSON et alii, 1988). Tais grânulos ocorrem abundantemente em acinetos maduros (FUHS, 1973). A susceptibilidade à deficiência de P têm sido observada por promover, nas cianobactérias, alterações no metabolismo durante o crescimento em meio deficiente, no decréscimo da taxa fotossintética, taxa respiratória e na taxa de fixação de nitrogênio (MARCO & DRUS, 1988).

De acordo com a literatura e como ficou constatado nesse estudo, o P é, reconhecidamente, um fator limitante ao crescimento de cianobactéria de vida livre. O decréscimo de biomassa registrado em meio deficiente desse

elemento sugere que o comportamento de cianobactérias crescidas em solos deficientes, provavelmente, seja semelhante àquele observado em laboratório. Portanto, para o estabelecimento adequado de cianobactérias ao solo(inóculo), o fósforo é um nutriente importante, visto que os teores deste na solução do solo, em geral, são muito baixos, devido ao fato de que o elemento apresenta baixa mobilidade, além de que, é prontamente absorvido pelas plantas quando disponível (RAIJ, 1987).

4.5. Estimativa da fixação biológica do nitrogênio em diferentes temperaturas de incubação

A atividade da enzima nitrogenase em cianobactérias do solo, medidas em termos de produção de etileno, mostrou pequenas variações ao longo do período amostral, às temperaturas de 20°, 25° e 35°C.

A produção máxima de etileno obtida foi de 4,87 nmoles $C_2H_4/\mu gCl_2.min^{-1}$, registrada 30 minutos após o início das mensurações em *Nostoc muscorum* à 25°C.

Todas as cianobactérias de clima tropical apresentaram um decréscimo na taxa de etileno produzido à temperatura de 20°C, e principalmente *N. commune* registrou uma atividade enzimática baixa, igual a 1,06 nmoles $C_2H_4/\mu gCl_2.min^{-1}$. Entretanto, *Nostoc sp.*, representativa

de solo temperado, exibiu uma taxa elevada de produção de etileno ($4,43 \text{ nmoles C}_2\text{H}_4/\mu\text{gCl}_2.\text{ml}^{-1}$) à mesma temperatura, o que correspondeu a 4 vezes a produção de etileno por *N. commune*.

A temperatura considerada ótima para a atividade da nitrogenase, pelas cianobactérias aqui estudadas variou entre 25° e 35°C , às condições experimentais. O efeito da temperatura sobre as taxas de redução de acetileno mostrou ser decisiva, tanto para as algas de clima tropical, quanto de clima temperado.

Em experimentos realizados no campo, JONES (1977) demonstrou nos solos da África do Sul a taxa diurna de redução de acetileno em cianobactérias. Essa, foi mais elevada no período da tarde, quando a temperatura do solo e a intensidade luminosa estavam em níveis mais baixos do que ao meio-dia. Estes estudos confirmaram que as taxas de redução de acetileno foram mais expressivas, entre $30-35^\circ\text{C}$, com inibições acima de 40°C .

A determinação das curvas de variação diurna para a atividade da nitrogenase em cianobactérias de vida livre, isoladas de solo do cerrado, mostrou a ocorrência de uma atividade máxima de redução de acetileno durante o período vespertino; e que fatores como a temperatura e a intensidade luminosa atuaram como controladores desta atividade (PONTES, 1988).

À temperatura de 35°C, a atividade da nitrogenase continuou sendo mais elevada do que a 20°C, somente para as espécies de *N. punctiforme* e *N. commune*. Essa última, foi a espécie que registrou a maior atividade enzimática a 35°C, diferindo das demais. Este comportamento pode estar refletindo a adaptabilidade de tais cianobactérias ao habitat de origem visto que as mesmas foram coletadas em regiões onde a temperatura média anual alcança 26 a 28°C (Região Amazônica) e 20 a 22°C (Vale do Paraíba). Em *Nostoc sp.*, entretanto, houve uma diminuição drástica da atividade da nitrogenase à 35°C, em relação às temperaturas de 20° e 25°C. Provavelmente, este fato deve estar associado às variações de temperatura que normalmente são comuns nos organismos de regiões temperadas, os quais tendem a ser inibidos ou diminuídos em suas atividades metabólicas, incluindo a atividade da nitrogenase, quando são mantidos em temperaturas constantes.

Para bactérias de solos, fixadoras de nitrogênio, JAIN et alii (1987), fez uma comparação da atividade de redução de acetileno em solos temperados e tropicais, a diferentes temperaturas. Ficou demonstrado que as bactérias de solos temperados se adaptaram melhor a baixas temperaturas, porque utilizaram mais eficientemente uma ampla faixa (5° a 40°C), na qual fixaram N₂. De fato,

nossos resultados também revelaram que, de maneira geral, as cianobactérias fixaram N_2 mais eficientemente nas condições semelhantes a de seus habitats naturais.

As estimativas da fixação de nitrogênio por autótrofos, em sistemas artificiais, nem sempre retratam as reais situações encontradas nos sistemas naturais, pois, em sistemas artificiais, as condições adversas são mais controladas, otimizando-se os resultados (PANICHSAKPATANA *et alii*, 1978). Igualmente, comparações de resultados obtidos com aqueles registrados em publicações, nem sempre são verdadeiras, pois as metodologias empregadas e as condições de ensaio podem ser totalmente diferentes (PONTES, 1988).

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos, tanto as cianobactérias de solo tropical, quanto de solo temperado, foram crescidas previamente, durante um período de 8 dias, nas referidas temperaturas de incubação, o que acreditamos ter influenciado de alguma forma a obtenção destes resultados. Um fator determinante da intensidade da atividade da nitrogenase em *Gloeotrichia pisum* foi sugerido ser as condições anteriores as quais os organismos foram submetidos antes da realização das mensurações (VALIENTE & LEGANES, 1989).

Nostoc punctiforme, *N. muscorum* e *N. commune* foram investigadas quanto à fixação de nitrogênio

em solos do Marrocos. As taxas para a atividade da nitrogenase registradas foram baixas, menores que 1,5 nmoles $C_2H_4/cm^2.h^{-1}$, apresentando padrões diurnos da atividade governados, principalmente, pelo efeito inibidor da temperatura, associada a altas intensidades luminosas (RENAULT *et alii*, 1975).

Correlação positiva entre o número de heterocistos versus etileno produzido foi observada em todas as temperaturas de incubação. Nas cianobactérias heterocistadas o sítio da nitrogenase está localizado no heterocisto, portanto, um número maior destas estruturas implica em numerosos sítios ativos da enzima, fixando o nitrogênio mais eficientemente. Entretanto, têm sido demonstrado que o número de heterocistos pode ser tomado apenas como um índice grosseiro da capacidade de fixação de nitrogênio e que uma relação quantitativa próxima entre a taxa de fixação e a concentração de heterocistos nem sempre tem ocorrido. A relação taxa de fixação de nitrogênio e heterocistos varia de acordo com as condições fisiológicas e as respostas aos fatores ambientais (FOGG, 1974). Portanto, o crescimento das cianobactérias em condições de laboratório, como foi conduzido, provavelmente tenha interferido, de tal maneira, que uma correlação direta entre heterocistos e fixação de nitrogênio tenha sido positiva.

4.6. Mutantes espontâneos de cianobactéria

4.6.1. Mutantes espontâneos resistentes ao MSX

O crescimento do mutante (+MSX^R), em meio contendo o análogo, revelou uma produção de biomassa inferior à produção de biomassa pelo tipo selvagem. Este fato tem sido registrado na literatura, onde o crescimento de mutantes MSX, de maneira geral, tem sido menor do que o encontrado para o tipo selvagem (CHAPMAN & MEEKS, 1983; SPILLER *et alii*, 1986; THOMAS *et alii*, 1990). É possível que a ação do MSX inibindo, irreversivelmente, a glutamina sintetase, enzima que cataliza a principal via enzimática de assimilação de amônia (NH₃) a partir do nitrogênio molecular (N₂) ou outras fontes exógenas de NH₄ como os fertilizantes, promova uma diminuição no crescimento dos mutantes, visto que haverá alterações na produção dos aminoácidos glutamina (principal produto inicial da via) e glutamato (o segundo produto mais importante do metabolismo de N₂ e NH₄⁺) durante o crescimento. Entretanto, a curva descrita pelo mutante crescido em presença ou ausência do análogo apresentou um aspecto diferente da do tipo selvagem. Foram registradas fase lag curta, para ambos e fase log muito longa e acentuada, após as primeiras 48 horas, para o mutante, sendo o tempo de geração também diferente do tipo selvagem.

O crescimento de mutantes espontâneos de *N. punctiforme*, em presença do análogo MSX, caracterizou-se pelo aparecimento de dois tipos distintos de colônias: colônias grandes, muito semelhantes as do tipo selvagem e colônias pequenas. Esta diferença morfológica, durante o período experimental, pode estar de acordo com a existência de uma possível alteração no transporte do MSX que foi expressa no mutante através da modificação fenotípica da colônia. A ação do análogo MSX foi investigada por CHAPMAN & MEEKS (1983) em culturas puras de *Anabaena variabilis* mostrando que, além das alterações bioquímicas, também ocorreram alterações morfológicas caracterizando os dois fenótipos distintos. Um fenótipo designado 7-2 (MSX) resistente, que formava colônias grandes, apresenta alterações no transporte de MSX. Neste caso, o MSX ligava-se à membrana celular afetando sua permeabilidade e bloqueando a entrada do MSX no citoplasma. O outro fenótipo, designado 5-1 (MSX) resistente, por sua vez, se caracterizava por formar colônias pequenas. Nestas células, o MSX alcançava o espaço intracelular, ligava-se a glutamina sintetase inibindo sua atividade e impedindo a formação de glutamina e glutamato. Essa inibição pode alcançar cerca de 89% do "pool" da enzima na célula.

A primeira consequência da inibição da

glutamina sintetase pelo análogo MSX, em células que formavam colônias pequenas é uma liberação do radical amônio (NH_4^+) no meio extracelular, isto porque, sendo o amônio o principal produto da fixação biológica do nitrogênio, ela poderá ser liberada extracelularmente, caso a GS seja inibida pelo MSX (TIWARI & MISHRA, 1991). A segunda consequência é que em organismos fixadores de nitrogênio, como as cianobactérias, a síntese e a atividade da nitrogenase são reguladas pela presença de amônia ao meio. Uma inibição da GS pelo análogo MSX ou por outros inibidores, tem permitido a obtenção de mutantes que produzem e sintetizam a enzima nitrogenase em meio contendo NH_4^+ (SPILLER *et alii*, 1986; SINGH & KUMAR, 1988; REGLINSKY *et alii*, 1989). Mutantes de *Anabaena variabilis*, e *Nostoc muscorum* resistentes ao MSX têm sido relatados por liberarem amônia ao meio, sendo por isto utilizados como biofertilizantes nitrogenados em campos de arroz irrigado (THOMAS *et alii*, 1990).

Mutantes espontâneos resistentes ao MSX, desreprimidos para a biossíntese da nitrogenase, podem ser identificados em uma população pelo crescimento em meio apropriado contendo indicadores de pH, visto que a produção e excreção de NH_4^+ por mutantes provoca um aumento do pH da cultura.

Nossos resultados mostraram que os mutantes

isolados a partir do crescimento em meio contendo MSX apresentavam atividade da enzima nitrogenase, medida através da redução de acetileno, registrando taxas mais elevadas de produção de etileno do que o observado para o tipo selvagem. Entretanto, mesmo obtendo dados tão semelhantes aqueles dos referidos autores, nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, não foi possível caracterizar fisiologicamente e bioquimicamente os mutantes isolados e confirmar ou não a hipótese. No momento, não se pode afirmar se tais mutantes são verdadeiramente desrepressores da nitrogenase e excretores de NH_4^+ , conforme os dados da literatura.

4.6.2. Mutantes espontâneos resistentes ao 5FC

Mutantes espontâneos de *N. muscorum* isolados através da resistência ao análogo pirimidínico da citosina (5FC) cresceram de maneira muito diferente que o tipo selvagem. O crescimento foi assinalado por fases distintas, lag e log, sendo esta última acentuada até o final do experimento. Tal característica marca o crescimento dos possíveis mutantes, tanto na presença quanto na ausência do análogo ao meio. A produção de biomassa, como reflexo do crescimento ao longo de 14 dias, entretanto, foi mais acentuada no tipo selvagem do que nos mutantes isolados.

A resistência ao 5FC para os mutantes espontâneos (+5FC^R), pode ocorrer tanto pela inativação da enzima citosina diaminase como pela inativação da enzima UMP (uridina monofosfato) pirofosforilase. As células dos mutantes que não apresentam a enzima UMP pirofosforilase crescem positivamente em meio suplementado com 5FC e 5FU, entretanto, aquelas células deficientes da enzima citosina diaminase crescem, somente, em presença do 5FC. Das 60 colônias escolhidas aleatoriamente, isoladas e selecionadas, 50% foram resistentes ao 5FU, e 50% resistentes ao 5FC. Quimicamente, uma mutação induzida foi estudada em *Anabaena variabilis* utilizando-se a resistência para o análogo pirimidínico 5'-fluorocitosina, como marcador genético, o qual podia ser selecionado positivamente. Entre os 100 mutantes testados, aleatoriamente, para a resistência ao 5FC e 5FU, 54 foram resistente ao 5FC, ou seja 50% (CHAPMAN & MEEKS, 1987). Os mutantes espontâneos de *N. muscorum* (+5FC^R) deste trabalho apresentaram resultados muito semelhantes ao descrito por CHAPMAN & MEEKS (1987), sendo, portanto, caracterizados quanto a resistência para o 5FC e o 5FU. Os resultados mostraram que mutantes fenotípicos de cianobactérias heterocistadas podem ser prontamente recuperadas, a partir de células que sobreviveram aos mutagênicos químicos.

Entretanto, o principal problema a ser

enfrentado em estudos genéticos de cianobactérias não é a mutação, propriamente dita, mas a seleção do mutante desejado. CHAPMAN & MEEKS (1983) demonstraram que o gene estrutural para a enzima glutamina sintetase pode ser alterado em elevadas frequências, porém não conseguiram isolar o mutante auxotrófico para glutamina. Este fato é totalmente apoiado, tendo em vista o número reduzido de cianobactérias citadas como mutantes auxotrofos e mesmo o número limitado de publicações.

5. CONCLUSÕES

1. A técnica de fragmentação das colônias seguida de repicagens sucessivas é eficiente, e simples, na obtenção de clones axênicos de cianobactérias.

2. O critério mais eficiente na determinação de biomassa é o conteúdo de clorofila *a*, que permite selecionar espécies de crescimento rápido.

3. A temperatura ótima para o crescimento de cianobactérias do solo de regiões tropicais variou entre 25°- 35°C, enquanto que para a espécie de região temperada foi igual a 20°C.

4. O valor de pH igual a 7,9 foi considerado ótimo para o crescimento de todas as espécies estudadas.

5. Com relação às concentrações crescentes de sal, *Nostoc muscorum* foi a cianobactéria mais tolerante ao estresse salino, enquanto *Nostoc sp* foi a espécie mais sensível.

6. A deficiência de fósforo (P) afetou o crescimento de todas as cianobactérias estudadas. *Nostoc*

muscorum apresentou a maior tolerância para o crescimento em presença de 0,02 μ M de P; enquanto *Nostoc commune* foi a espécie mais sensível.

7. A atividade máxima da enzima nitrogenase foi obtida à 25°C (*Nostoc muscorum*) e a mínima à 35°C (*Nostoc* sp.).

8. *Nostoc punctiforme* - MSX^R, mutante espontâneo resistente ao análogo MSX, apresentou alterações morfo-fisiológicas diferentes do tipo selvagem.

9. Os mutantes espontâneos resistentes ao análogo 5FC de *Nostoc muscorum* (5FC^R), apresentaram alterações no sistema enzimático caracterizado pelo crescimento de 50% de suas células em meio contendo o análogo 5FU.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.M. Methods for Cyanophyceae. In: STEIN, J.K.; ed. Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. New York, Cambridge Univ. Press, 1973. p. 127-138.

ALLEN, M.B.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. Plant Physiol, 30:366-372, 1955.

ALLEN, M.M. & STANIER, R.Y. Selective isolation of blue-green algae from water soil. J. Gen. Microbiol., 51: 203-209, 1968.

APTE, S.K.; REDDY, B.R. & THOMAS, J. Relationship between sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol., 53(8): 1934-1939, 1987.

APTE, S. K.; & THOMAS J. Effect of sodium on nitrogen

fixation in *Anabaena torulosa* and *Plectonema boryanum*.

J. Gen. Microbiol., 130: 1161 - 1168, 1984.

ASTIER, C.; JOSET-ESPARDELLIER, F. & MEYER, I. Conditions for mutagenesis in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6714. Influence of repair phenomena. Arch. Microbiol., 120: 93-96, 1979.

BISOYI, R.N. & SINGH. Effect of seasonal changes on cyanobacterial production and nitrogen-yield. Microb. Ecol., 16: 149-154, 1988.

BOLD, H. & WYNNE, M.J. Introduction to the algae. 2^a ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 1985. 720 p.

BRAUN, A.C. & WOOD, H.N. On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 1776-1782, 1962.

CHAPMAN, J.S. & MEEKS, J.C. Glutamine and glutamate transport by *Anabaena variabilis*. J. Bacteriol., 156(1): 122-129, 1983.

CHAPMAN, J.S. & MEEKS, J.C. Conditions for mutagenesis of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. J. Gen. Microbiol., 133: 11-118, 1987.

DAVEY, M.C. Ecology of terrestrial algae of the fellfield ecosystems of signy island, South Orkney Islands. Br. Antart. Surv. Bull., 80: 69-74, 1988.

DAVEY, M.C. & CLARKE, K.J. The spatial distribution of microalgae on Antartic fellfield soils. Antartic Science, 3(3): 257-263, 1991.

DESIKACHARY, T.V. Cyanophyta. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research, 1959. 686p.

ENDERLIN, C.S. Pure culture, reconstitution, and physiology of the simbiotic association between the bryophyte Anthoceros and the cyanobacterium Nostoc. Davis, California, University of California, 1986. 134p. (Doutorado).

ENDERLIN, C.S. & MEEKS, J.C. Pure culture and reconstitution of the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association. Planta., 158: 157-165, 1983.

EPSTEIN, E. Nutrição Mineral das plantas: princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos; S.P., Ed. Universidade de São Paulo, 1975 341p.

ESTEVEES, M.R. Dinâmica da fixação de nitrogênio pela comunidade periférica de Eichhornia azurea Kunt em um ecossistema de planície de inundação do Rio Mogi-Guaçu (Lagoa do Infernãõ). São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1990. 122 p. (Dissertação).

FERNANDEZ-VALIENTE, E.; MAESO, E.S. & PINAS, F.F. Effect of sodium deficiency on ammonium-grown cells of *Anabaena* PCC 7119. Plant Cell Physiol., 29(8): 1433-1436, 1988.

FERNANDEZ-VALIENTE, E. & LEGANES, F. Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in cyanobacterium *Nostoc* UAM 205. J. Plant Physiol., 135: 623-627, 1989.

FERRIS, M.J. & HIRSCH, C.F. Method for isolation and purification of Cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol.; 57 (5): 1448 - 1452, 1991.

FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P. & WALSBY, A.E. The blue-green algae. London, Academic Press. 1973. 459 p.

FOGG, G.E. Nitrogen fixation. In: STEWART, W.D.P.; ed., Algal physiology and biochemistry. Berkeley, University California Press, 1974. p. 560 - 582.

FRITZ-SHERIDAN, R.P. Physiological ecology of nitrogen fixing blue-green algal crusts in the upper-subalpine life zone. J. Phycol., 24: 302-309, 1988.

FRIZSTCHE, C. & NIEMANN, E.G. Nitrogen - fixation in continuous culture with NH_4Cl - containing media. Appl. Environ. Microbiol., 56 (4): 1160 - 1161, 1990.

FUHS, G.W. Cytochemical Examination. In: Carr; N.G. & WITTHON; B.A. ed. The biology of blue-green algae. Berkeley, University California Press, 1973. p. 117-143.

GABBAY, R. & TEL-OR, E. Cyanobacterial biomass production in saline media. Plant Soil, 89: 107-116, 1985.

GURUDUTTA, G.U.; GHOSH, R.; NAMBIAR, K.M.R. & SINGH. Characterization of glutamine synthetase and ATPases in a mutant strain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* capable of metabolizing methylamine as a source of nitrogen. J. Plant Physiol., 127: 307-322, 1987.

HAMDI, Y.A. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos Roma, FAO, 1985. p. 45-188. (v.49).

HEALEY, F.P. Phosphate. in: CARR, N.G. & WITTON, B.A.; ed., The biology of cyanobacteria. Oxford, Blackwell Sci. Publ. 1982. p. 105-124.

HENRIKSSON, E.; HENRIKSSON, L.E. & Da SILVA, E.J. A comparison of nitrogen fixation by algae of temperate and tropical soils. In: STEWART, W.D.P., ed., Nitrogen fixation by free-living microorganisms. New York, Cambridge University Press, 1975. p. 199-218 (IBP 6).

HERDMAN, M. & CARR, N.G. The isolation and characterization of mutants strains of the blue-green alga *Anacystis nidulus*. J. Gen. Microbiol., 70: 213-220, 1972.

HOFFMANN, R. & VIEIRA, J. Análise de regressão: uma introdução a econometria. 2^o ed. São Paulo, HUCITEC, 1977. 339 p.

HOLM-HANSEN, O. Ecology, physiology, and biochemistry of blue-green algae. Ann. Rev. Microbil., 22: 47-70, 1968.

JAIN, D.K.; BEYER, D. & RENNIE. Dinitrogen fixation (C_2H_2

reduction) by bacterial strain at various temperature. Plant and Soil, 103: 233-237, 1987.

JHA, M.N.; VENKATARAMAN, G.S. & KAUSCHIK, B.D. Response of *Westiellopsis prolifica* and *Anabaena* sp. to salt stress. Mircen J., 3: 307-317, 1987.

JONES, K. Acetylene reduction by blue-green algae in subtropical grassland. New Phytol., 78: 421-426, 1977.

JOSEPH, C.M. Glutamine synthetase regulation in symbiotic cyanobacteria. Davis - California, University of California, 1986. 63p. (Doutorado)

JUTONO. Blue-green algae in rice soil of Jogjakarta, Central Java. Soil Biol. Biochem., (5): 91-95, 1973.

LEFORT-TRAN, M.; POUPHILE, M.; SPATH, S. & PACKER, L. Cytoplasmic membrane changes during adaptations of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311 to salinity. Plant Physiol., 87: 767-775, 1988.

LEVITT, J. Response of plants to environmental stress. 2nd ed. California, Academic Press, 1980. 488 p.

LOURA, I.C.; DUBACQ, J.P. & THOMAS, J.C. The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. Plant Physiol., 83: 839-843, 1987.

MacRAE, I.C. & CASTRO, T.F. Nitrogen fixation in some tropical rice soils. Soil Science, 103(4): 277-280, 1966.

MARCO, E. & ORUS, M.I. Variation in growth and metabolism with phosphorus nutrition in two cyanobacteria. J. Plant Physiol., 132: 339-344, 1988.

MEEKS, J.C. & CASTENHOLZ, R.W. Growth and photosynthesis in extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). Arch. Mikrobiol., 78: 25-41, 1971.

MEEKS, J.C. & CASTENHOLZ, R.W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* - I. Effect of temperature on fluorescence and enhancement of CO₂ assimilation. J. thermal Biol., 3: 11-18, 1971.

MEEKS, J.C.; WYCOFF, K.L.; CHAPMAN, J.S. & ENDERLIN, C.S. Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1351-1359, 1983.

MURRY, M.A.; HORNE, A.J. & BENEMANN, J.R. Physiological studies of oxygen protection mechanisms in heterocysts of *Anabaena cylindrica*. Appl. Environ. Microbiol., 47(3): 449-454, 1984.

NIEVA, M.; AVENDANO, M.C.; SANCHEZ MAESO, E. & FERNANDEZ VALIENTE, E. Effect of sodium deficiency on mixotrophic cultures of *Anabaena variabilis*. J. Plant Physiol., 136: 626-630, 1990.

OTHMAN, R. & WOLLUM, II, A.G. Evaluation of some methods for enumeration of nitrogen - fixing blue-green algae in soil. The journal of the Elisha Mitchell Scientific Society, 103 (3): 94-100, 1987.

PANICHSAKPATANA, S.; WADA, H.; KIMURA, M.; TAKAY, Y. Nitrogen fixation in paddy soils. II. A model experiment for paddy soil. Soil Sci. Plant Nutr., 24 (3): 367-373, 1978.

PETTERSSON, A.; HALLBOM, L.; & BERGMAN, B. Aluminium effects on uptake and metabolism of phosphorus by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Plant Physiol., 86: 112-116, 1988.

PONTES, M.C.F. Contribuição de nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado. São Carlos, SP. 1988. 161p. (Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos).

PONTES, M.C.F.; & SANTOS, J.E. Análise qualitativa e quantitativa da comunidade algal em solo de cerrado (Campus da UFSCarlos, São Carlos, SP). An. Sem. Reg. Ecol., VI: 219-230, 1988.

PONTES, M.C.F.; BALLESTER, M.V.R. & SANTOS, J.E. Variação diurna da redução do acetileno por cianobactérias de vida livre. Ciência e Cultura, 41(3): 288-291, 1989.

PRASAD, P. & KASHYAP, A.K. Characteristics of ammonium transport in an alkalophilic diazotrophic cyanobacterium *Mostoc calcicola*: influence of temperature and methionine sulfoximine. J. Plant Physiol; 136: 149-154, 1990.

RAIJ, B.V. Avaliação da fertilidade do solo. Piracicaba, POTAFOS, 1987. 142p.

RAJALAKSHMI, N. Influence of combined nitrogen on growth of cyanobacteria. Proc. Indian Acad. Sci., 95(5): 315-320. 1985.

REDDY, B.R.; APTE, S.K. & THOMAS, J. Enhancements of cyanobacterial salt tolerance by combined nitrogen. Plant Physiol., 89: 204-210, 1989.

REGLINSK, A.; ROWELL, P.; KERBY, N.W. & STEWART, W.D.P. Characterization of methylammonium/ammonium transport in mutant strain of *Anabaena variabilis* resistant to ammonium analogues. J. Gen. Microbiol., 135: 1441-1451, 1989.

RENAULT, J.; SASSON, A.; PEARSON, H.W.; STEWART, W.D.P. Nitrogen - fixing algae in Morocco. In: STEWART, W.D.P.; ed.; Nitrogen fixation by free-living microorganisms. New York, Cambridge University Press, 1975. p.229-246. (IBP V.6).

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. Generic assignments, strains histories and properties of pure culture of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., 111: 1-61, 1979.

RIPPKA, R. WATERBURY, J.B. & STANIER, R.J. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In: STAR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G. BALOUS, A. & SCHLEGEL, H.C.; eds. The prokaryotes. A handbook on

habitats, isolation and identification of bacteria.

Berlin. Springer-Verlag. 1981. V. 6, p. 212-220.

ROGER, P.A. & KULASOORIYA, S.A. Blue-green algae and rice. The Internacional Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 1980. 112 p.

ROGER, P.A. & REYNAUD, P.A. Ecology of blue-green algae in paddy fiels. In: Nitrogen and rice. Los Baños, Philippines, Internacional Rice Research Institute. 1979. p. 289-309.

ROGER, P.A. & REYNAUD, P.A. Free-living blue-green algae in tropical soils. In: DOMMERGUES, Y.R. & DIEMS, H.G.; eds.; Microbiology of tropical soils and plant productivity. Boston, Martinus Nighoff/Dr. W. Junk Publ., 1982. p. 147-168.

ROGER, P.A. & WATANABE, I. Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. Fertilizer Res., 9(1-2): 39-79, 1986.

ROUND, F.E. Biologia das algas. 2^o ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Dois, 1983. 263 p.

- SAHA, K.C. & MANDAL, L.N. Effect of algal growth on the availability of phosphorus, iron and manganese in rice soil. Plant and Soil, 52: 139-149, 1979.
- SHIRAI, M; OHTAKE, A.; SAND, T.; MATSUMOTO, S.; SAKAMOTO, T.; SATO, A.; AIDA, T.; HARADA, K.; SHIMADA, T.; SPILLER, H.; LATORRE, C.; HASSAN, M.E.; & SHANMUGAM, K.T. Isolation and Characterization of nitrogenase - derepressed mutant strains of cyanobacterium *Anabaena variabilis*. J. Bacteriol., 165 (2): 412-419, 1986.
- STAL, L.J.; GROSSBERG, S. & KRUMBEIN, W.E. Nitrogen fixation associated with the cyanobacterial mat of a marine laminated microbial ecosystem. Mar. Biol., 82: 217-224, 1984.
- STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocytous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch Microbiol., 143: 72-76, 1985.
- STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch Microbil., 149: 76-80, 1987.

STANIER, R.Y. & COZEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol., 31: 225-274, 1977.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; & COHEN - BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). Bact. Rev., 35 (2): 171-205, 1971.

STEINBER, N.A. & MEEKS, J.C. Photosynthetic CO₂ fixation and ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activity of *Nostoc* sp. Strain UCD 7801 in Symbiotic association with *Anthoceros punctatus*. J. Bacteriol., 171 (11): 6227-6233, 1989.

STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation in the sea. In: COST-LOW, J.D.; ed., Fertility of the sea, London, Gordon and Breach Press, 1971. p. 537-567.

STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A.; ed., The biology of blue-green algae. Berkeley, University California Press. 1973. p. 260-278. (Botanical Monographs, V. 9).

STEWART, W.D.P. Nitrogen fixing cyanobacteria and their

associations with eukaryotic plants. Endeavour, New Series, 2(4): 170-178, 1978.

STEWART, W.D.P.; F.R.S.; ROWELL, P.; KERBY, N.W.; REED, R.H. & MACHRAY, G.C. N₂-fixing cyanobacteria and their potencial applications. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 317: 245-258, 1987.

SUTTLE, C.A. & HARRISON, P.J. Phosphate uptake rates of phytoplankton assemblages grown at different dilution rates in semicontinuous culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43: 1474-1481, 1986.

THOMAS, J. & APTE, S.K. Sodium requirement and metabolism in nitrogen-fixing cyanobacteria. J. Biosci., 6: 771-794, 1984.

THOMAS, S.P.; ZARITSKY, A. & BOUSSIBA, S. Ammonium excretion by an L-methionine-DL-sulfoximine resistant mutant of the rice field cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Appl. Environ. Microbiol., 56(11): 3499-3504, 1990.

VENKATARAMAN, G.S. Blue-green algae: a possible remedy to nitrogen scarcity. Curr. Sci., 50: 253-256, 1981.

VU VAN VU; WONG FONG SANG, H.W.; KIJNE, J.W.; PLANQUE, K. & KRAAYENHOF. Effects of temperature, pH and bound nitrogen on photosynthesis and nitrogen fixation of *Azolla pinnata* (Xanh, Vietnam) and *Azolla filiculoides* Lam. Photosynthetica, 20(1): 67-73, 1986.

WATANABE, A. On inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen - fixing blue-green algae. Soil. Biol. Biochem.; 5(1): 161-162, 1973.

WATANABE, C.L. & SANTIAGO-VENTURA, T. Response to high temperature of the *Azolla* - *Anabaena* association, determined in both the fern and in the cyanobacterium. New Phytol., 111: 625-630, 1989.

WATANABE, I. Nitrogen fixation by non-legumes in tropical agriculture in special reference to wetland rice. Plant and Soil, 90: 343-357, 1986.

WATANABE, I. & YAMAMOTO, Y. Algal nitrogen fixation in the tropics. Plant Soil (special vol.): 403-413, 1971.

WHITE, P.A.; KALFF, J.; RASMUSSEN, J.B. & GASOL, J.M. The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and

marine habitats. Microb. Ecol., 21: 99-118, 1991.

WHITTON, B.A. & CATLING, H.D. Algal ecology of deepwater rice-fields in Thailand. Arch. Hydrobiol., 105(3): 289-297, 1986.

WILCOX, M.M.; G.J. & SMITH R.J. Spatial control of differentiation in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. In: SCHLESSINGER; eds, Microbiology. Washington, DC, American Society for Microbiology. 1975. p. 453-463.

WOLK, C.P. Heterocysts, ^{15}N , and N_2 -fixing plants. In: NEWTON, W.E. & ORME-JOHNSON, W.H.; ed.; Nitrogen fixation. Baltimore, University Park Press, 1980. V. 2. p. 279-292.

WOLK, C.P. Physiology and cytological chemistry of blue - green algae. Bact. Rev., 37 (1): 32-101, 1973.

WOLK, C.P.; VONSHAK, A.; KEHOE, P. & ELHAI, J. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. Proc Natl. Acad. Sci. U.S., 81: 1516-1565, 1984.

WYNN-WILLIAMS, D.D. Ecological aspects of Antarctic microbiology. Advances in Microbial Ecology, 11: 71-146, 1990a.