
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

DANILO CAMARGO SANTOS

**AÇÃO ALELOPÁTICA DE SAXITOXINAS E MICROCISTINAS EM
CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS VERDES EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Fevereiro - 2013

DANILO CAMARGO SANTOS

**AÇÃO ALELOPÁTICA DE SAXITOXINAS E MICROCISTINAS EM
CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS VERDES EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientadora: Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

**Rio Claro
2013**

DANILO CAMARGO SANTOS

**AÇÃO ALELOPÁTICA DE SAXITOXINAS E MICROCISTINAS EM
CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS VERDES EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Biologia
Vegetal).

Comissão Examinadora

Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Viviane Moschini Carlos

Ana Teresa Lombardi

Rio Claro, 21 de Fevereiro de 2013

*I can almost see it, that dream I'm dreaming.
But there's a voice inside my head saying, you'll never reach it.
Every step I'm taking, every move I make, feels lost, with no direction.
My faith is shaking, but I, I gotta keep trying, gotta keep my head held high.
There's always gonna be another mountain, I'm always gonna wanna make it move.
Always gonna be an uphill battle, sometimes I'm gonna have to lose.
Ain't about how fast I get there, ain't about what's waiting, on the other side.
It's the climb.
The struggles I'm facing, the chances I'm taking, sometimes might knock me down.
But no I'm not breaking, I may not know it.
But these are the moments that, I'm gonna remember most.
Just gotta keep going, and I, I gotta be strong, just keep pushing on.
There's always gonna be another mountain, I'm always gonna wanna make it move.
Always gonna be an uphill battle, sometimes I'm gonna have to lose.
Ain't about how fast I get there, ain't about what's waiting on the other side.
It's the climb.*

Miley Cyrus – The Climb

Aos meus pais, Aleide e Edson, madrasta e padrasto, Marialda e César, meus avós, Maria e Valdomiro, e a minha namorada, Ingridy, por todo o ombro amigo e carinhoso. E claro, a todos os amigos que sempre acreditaram na realização desse sonho.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por toda a força nos momentos difíceis.

À minha mãe, Aleide, pelo apoio incondicional ao meu trabalho e palavras de carinho e, às vezes, nem tanto carinho assim (mas não menos importantes) que me ajudaram a seguir em frente com esse sonho.

Ao meu pai, Edson, também pelo apoio incondicional ao meu trabalho, visitas à Piracicaba e ótimas conversas sobre tudo o que rodeou o meu mestrado e minha vida pessoal.

Aos meus avós, Maria Auta e Valdomiro, além dos meus tios, Marisa e Jadir, que foram verdadeiros refúgios sentimentais e sempre me ofereceram um cantinho para eventuais abrigos em São Paulo.

À minha namorada, Ingridy, por apoiar a minha vinda para São Paulo e a busca pelo meu sonho profissional, por estar ao meu lado nos momentos mais críticos e sempre ter uma palavra de incentivo.

Aos “second parents”, Marialda e César, pelo apoio em todas as vezes que retornei ao Espírito Santo e pelo incentivo em continuar até o fim.

À professora doutora Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, por ter aceitado o desafio de orientar um Danilo desacreditado, porém cheio de vontade de querer produzir, e por ter me proporcionado um grande crescimento pessoal e científico.

Às professoras doutoras Ana Teresa Lombardi e Viviane Moschini Carlos, por terem aceitado o convite para participar da banca da defesa da dissertação e pela disposição em avaliar com qualidade o texto apresentado.

Aos amigos do Laboratório de Cianobactérias da ESALQ-USP, Viviane Piccin, Helton Soriano, Micheline Kézia, Ítalo Macedo, Cássia Figueiredo, Karina Cienciano, Ingrid Bardini e Camila Lira, pelos conselhos, revisões, ombro amigo e momentos de “relax” durante a rotina de trabalho.

À Micheline Kézia, pelo auxílio fundamental com os testes ELISA e discussões sobre o corpo do meu trabalho.

Aos amigos da turma de mestrado 2011 da UNESP de Rio Claro, Bruno Crulhas, Thaís Riolfi e Tiago Haruo (Equipe Sem Fronteiras algótica); Rita de Cássia, Luis Felipe Daibes, Milene “Engenheira”, Letícia Poli e Carolina Santiago, pelos momentos de descontração, ombro amigo e científico, esfiharia e altos papos no facebook algumas madrugadas afora (importantes para o alívio da tensão e solidão).

A Tiago Haruo e Aurélio Fajar, pelos papos e conselhos importantes sobre minha vida acadêmica e meu trabalho de mestrado, além da companhia de mochila e zuação durante o mês de Julho de 2012 (Man, I have to tell you something!).

À Vanessa, pela ajuda valiosa com a documentação da minha matrícula, qualificação e defesa de dissertação de mestrado e pela simpatia no atendimento prestado.

Ao “Cometa”, pelos inúmeros auxílios prestados ao Laboratório de Cianobactérias durante a realização do meu trabalho de mestrado.

Ao professor doutor Carlos Tadeu Dias Santos, pela ajuda única com o tratamento estatístico dos meus dados.

Ao professor doutor Renato Molica, pela análise em HPLC do teor de saxitoxinas e microcistinas, utilizando equipamento e pessoal de seu próprio laboratório, além das valiosas dicas de textos e referências para minha dissertação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado entre os meses de Abril e Julho de 2011.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado e reserva técnica entre os meses de Agosto de 2011 a Março de 2012.

À UNESP de Rio Claro, pela aprovação no curso de mestrado e oferecimento de ótimas disciplinas para meu enriquecimento científico e profissional.

À ESALQ – USP, por permitir a utilização das instalações do Laboratório de Cianobactérias, Restaurante Universitário e Biblioteca.

À equipe do Laboratório de Solos, coordenado pelo professor Márcio Lambais, pela ajuda ímpar com a utilização do ultrassonicador.

À Valéria Oliveira Fernandes, pelas palavras de incentivo e pela oportunidade de participar da banca de um de seus alunos e assim poder enxergar pontos que deveriam ser melhorados em meu trabalho.

À Georgette Salvador, pela ajuda na discussão dos meus dados de cultivos e incentivo para finalizar essa etapa acadêmica.

À Juliana Tischer, por oferecer ombro amigo, incentivo e pelas conversas importantes sobre o trabalho acadêmico e futuro científico.

Resumo

A alelopatia é definida como um efeito prejudicial ou benéfico provocado por substâncias produzidas por microrganismos ou plantas sobre fungos, plantas, bactérias ou algas. Muitos trabalhos sugerem que cianotoxinas provocam efeitos alelopáticos em organismos fitoplanctônicos. Todavia, muitos estudos utilizaram concentrações de toxinas superiores àquelas normalmente encontradas nos ecossistemas aquáticos ($>10\mu\text{g.L}^{-1}$), por isso nossa hipótese é que, em baixas concentrações, cianotoxinas não provocam efeitos alelopáticos. Esse estudo visa avaliar os possíveis efeitos alelopáticos das saxitoxinas (SX) nas densidades celulares das linhagens de microalgas verdes *Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová CMEA/UFF0201 e *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat UFSCar036, e das cianobactérias *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek BCCUSP11 e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing BCCUSP232, assim como os de microcistinas (MC) na densidade celular das linhagens *M. wesenbergii* BCCUSP11 e *M. aeruginosa* BCCUSP232, em quatro diferentes concentrações até $10\mu\text{g.L}^{-1}$. Seis experimentos, com 14 dias de duração, foram realizados em câmaras com condições controladas de temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo (14:10h claro:escuro) e luz ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). O controle e os tratamentos foram triplicados e realizados em meio de cultura ASM-1 (pH 7,4), com densidade celular inicial de $1,0 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$. Os extratos brutos com presença e ausência de SX (SX+ e SX-) ou MC (MC+ e MC-), provenientes de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya & Raju e de *M. aeruginosa*, respectivamente, foram adicionados nos cultivos dos tratamentos 0.5, 1.0, 5.0 e 10.0 SX ou MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ de toxina no 4º dia. Não foi adicionado qualquer extrato aos controles. Foram obtidas as concentrações de SX ou MC do 4º e 14º dia de cada experimento através de testes ELISA. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade, além de ANOVA e teste de Tukey para determinar as diferenças significativas ($p<0,05$). Nos experimentos com SX, *M. convolutum* CMEA/UFF0201 não sofreu efeito alelopático, enquanto *S. acuminatus* UFSCar036 e *M. wesenbergii* BCCUSP11 foram inibidas pelos extratos brutos de *C. raciborskii*, principalmente nos tratamentos 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$. *M. aeruginosa* BCCUSP232 foi inibida apenas a 10,0 SX

$\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato bruto SX+, mas teve sua produção de MC estimulada nos tratamentos 5,0 e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ do extrato SX+. Inicialmente, as concentrações de neo-saxitoxinas (neo-SX) foram maiores que SX em todos os experimentos. As concentrações de SX e neo-SX sofreram redução ao longo dos experimentos, sendo registrados maiores valores de concentração final de SX do que neo-SX. Nos experimentos com MC, o extrato MC+ estimulou o aumento da densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232 no tratamento 10 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, os extratos MC+ e MC-, nos tratamentos 10 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$, inibiram *M. wesenbergii* BCCUSP11. Em relação ao 4º dia, as concentrações de MC foram menores no fim do experimento com *M. wesenbergii* BCCUSP11, mas foi maior no fim do experimento com *M. aeruginosa* BCCUSP232, sendo que o extrato MC- estimulou mais a produção de MC por essa linhagem do que MC+ no tratamento 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nossos resultados refutaram parcialmente nossa hipótese, pois mostraram que SX e MC provocaram efeitos alelopáticos específicos em cada linhagem-alvo em concentrações geralmente relatadas para corpos d'água, além de indicarem que outras substâncias participaram das relações alelopáticas. Por fim, a presença de SX parece estimular a produção de MC por *M. aeruginosa*.

Abstract

Allelopathy is defined as stimulating or inhibitory effect caused by substances produced by plants or microorganisms in fungus, plant, bacteria or algae. Cyanotoxins seem to induce allelopathical effects in phytoplanktonic organisms, as is suggested by some studies. However, these studies were performed with high toxins concentrations, which are higher than normally is reported for aquatic ecosystems ($>10\mu\text{g.L}^{-1}$). We hypothesize that, under low concentrations, cyanotoxins do not cause allelopathical effects. This study aimed to evaluate the possible allelopathical effects of saxitoxins (SX) in the cell density of four target strains: the green algae *Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová CMEA/UFF0201 and *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat UFSCar036, the cyanobacterium *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek BCCUSP11 and *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing BCCUSP232. We also aimed to evaluate the allelopathical effects of the microcystins (MC) in the cell density of two cyanobacterium target strain, *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek BCCUSP11 and *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing BCCUSP232, by using four different concentrations up to $10\mu\text{g.L}^{-1}$. Each of the six experiments last 14 days and were performed in incubation chambers with controlled temperature ($24\pm 1^\circ\text{C}$), photoperiod (14:10h light:dark) and light intensity ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The control treatment and all the others were triplicated with initial cell density of $1,0 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$, cultivated in ASM-1 medium (pH 7,4). The crude extracts with and without SX (SX+ or SX-) or MC (MC+ or MC-), obtained from *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszinska) Seenayya & Raju and *M. aeruginosa*, respectively, were added to the treatments cultures on the 4th day, using the following toxin concentrations: 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 SX or MC $\mu\text{g.L}^{-1}$. No extract was added in control cultures. SX or MC concentrations of each experiment were obtained by ELISA test on the 4th and 14th day of experiments. All data were submitted to a normality and homocedasticity test, followed by ANOVA and Tukey test to elucidate the significant differences between the control and the other treatments ($p<0,05$). In SX experiments, *M. convolutum* CMEA/UFF0201 was not affected by the extracts SX+ and SX-. *S. acuminatus* UFSCar036 e *M. wesenbergii* BCCUSP11 were inhibited by the two *C. raciborskii* extracts, mainly by 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$.

¹ treatments. *M. aeruginosa* BCCUSP232 was inhibited only by 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ SX+ treatment, but the MC production was stimulated by 5,0 and 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ SX+ treatments. Initially, the neo-saxitoxin (neo-SX) concentrations were higher than SX concentrations in all experiments. The SX and neo-SX concentrations reduced during the experiments and, at the end of all the experiments, SX concentrations were higher than neo-SX. For MC experiments, the MC+ extract in 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ treatment increased the *M. aeruginosa* BCCUSP232 cell density. On the other hand, the MC+ and MC- extracts, in 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$, inhibited *M. wesenbergii* BCCUSP11. Comparing with 4th day, the MC concentrations were lower in the final of *M. wesenbergii* BCCUSP11 experiment, but were higher in *M. aeruginosa* BCCUSP232 experiment. The MC- extract, in 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ treatment, stimulated a higher MC production, with comparison to the MC+ extract. The results partially refused our hypothesis, since SX and MC induced specific allelopathical effects in each target strain when using toxins concentrations generally reported in water bodies, besides indicating that other substances than SX ou MC may participate of the allelopathical relationships. Finally, the SX seems to stimulate the MC production by *M. aeruginosa*.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da microcistina-LR, a variante mais conhecida das microcistinas (A); e da saxitoxina (B) 20

Capítulo 1:

Figura 1. Densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆-), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇-), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲-), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△-), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...■...), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...□...). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (*) e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). O extrato SX+ provocou efeito alelopático na densidade celular após o 6º dia, enquanto que o SX- inibiu a densidade celular a 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ somente no 14º dia 62

Figura 2. Densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆-), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇-), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲-), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△-), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...■...), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...□...). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). O extrato SX+ provocou efeito alelopático para 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no 12º e 14º dia. O extrato SX- inibiu a densidade celular do tratamento 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ somente no 12º dia. 63

Figura 3. Densidade celular de *S. acuminatus* UFSCar036. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆-), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇-), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲-), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△-), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...■...), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (...□...). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (*) e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). Os extratos SX+ e SX- provocaram igualmente efeitos alelopáticos nas densidades celulares no 12º e 14º dia. 64

Figura 4. Densidade celular de *M. convolutum* CMEA/UFF0201. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆·), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇·), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲--), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△--), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··■··), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··□··). Adição dos extratos (Seta). Os extratos SX+ e SX- não provocaram efeitos alelopáticos nas densidades celulares 65

Figura 5. Concentrações iniciais e finais de neo-SX e SX nos experimentos. A: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11. B: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. C: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *S. acuminatus* UFSCar036. D: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. convolutum* CMEA/UFF0201. Diferença significativa de concentração de neo-SX e SX entre o dia da aplicação do extrato (4º dia) e o fim do experimento (*). De modo geral, a concentração inicial de neo-SX foi sempre maior que SX. No fim de todos os experimentos, houve sempre redução dos dois análogos, sendo a concentração de SX sempre maior que neo-SX 66

Figura 6. Concentrações iniciais e finais de MC no experimento com *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato SX+. B: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato SX-. Diferença significativa de concentração de MC entre o dia da aplicação dos extratos (4º dia) e o fim do experimento (*). O extrato SX+ estimulou mais a produção de MC em relação ao extrato SX-, principalmente nos tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ 68

Capítulo 2:

Figura 1: Densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11. A: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP232 MC+. B: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP03 MC-. Controle (—), 0,5 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆·), 0,5 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇·), 1,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲--), 1,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△--), 5,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··■··), 10,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··□··). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (*) e entre os tratamentos 10,0 MC

$\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). Os extratos MC+ e MC- provocaram efeito alelopático na densidade celular em seus respectivos tratamentos 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ após o 6º dia 92

Figura 2. Densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP232 MC+. B: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP03 MC-. Controle (—), 0,5 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆·), 0,5 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇·), 1,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--▲--), 1,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (--△--), 5,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··■··), 10,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··□··). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre o tratamento 10,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). O extrato MC+ aumentou a densidade celular do tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ após o 6º dia 93

Figura 3. Concentrações iniciais e finais de MC nos experimentos. A: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC+ no experimento com a linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11. B: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC+ no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. C: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC- no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferença significativa de concentração de MC entre o dia da aplicação do extrato (4º dia) e o fim do experimento (*). Para *M. wesenbergii* BCCUSP11, Não houve diferença significativa para as concentrações de MC apenas no tratamento 0,5 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ do extrato MC+. Para *M. aeruginosa* BCCUSP232, não houve diferença significativa para as concentrações de MC apenas nos tratamentos 1,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ do extrato MC- 94

Lista de Tabelas

Capítulo 1:

Tabela 1. Tratamentos realizados com as linhagens-alvo (*Microcystis wesenbergii* BCCUSP11, *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232, *Scenedesmus acuminatus* UFSCar036 e *Monoraphidium convolutum* CMEA/UFF0201) e extratos brutos de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEPA1 (SX+) e ITEP31 (SX-). Concentrações de SX totais dos extratos brutos (SX+) e (SX-) obtidas por HPLC ($\mu\text{g.L}^{-1}$), concentrações iniciais (4^o dia) e finais (14^o dia) de neo-SX e SX obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Decréscimo (%) da concentração inicial de neo-SX e SX. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. ITEP: Instituto Tecnológico de Pernambuco. UFSCar: Universidade Federal de São Carlos. CMEA/UFF: Coleção Maria Elisabeth Aidar da Universidade Federal Fluminense Não se aplica (NA) 70

Tabela 2. Padrões utilizados para análise do extrato bruto de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEPA1 (SX+) através da técnica de HPLC, concentrações obtidas ($\mu\text{g.mg}^{-1}$) e a contribuição de cada análogo na concentração total obtida (%). Ausência da variante (-). Não se aplica (NA) 72

Tabela 3. Tratamentos realizados com a linhagens-alvo *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232, concentrações de SX totais dos extratos brutos (SX+) e (SX-) obtidas por HPLC e concentrações iniciais (4^o dia) e finais (14^o dia) de MC obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Acréscimo (%) da concentração inicial de MC. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. ITEP: Instituto Tecnológico de Pernambuco 73

Tabela 4. Valores de afinidade (%) entre os análogos de SX e MC e os substratos dos kits Beacon (Beacon Analytical Systems Inc.) utilizados para as análises ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Informações obtidas diretamente do fabricante. Ausência (-). Faixas de detecção de neo-SX, SX MC, em partes por bilhão (ppb): 0,15 – 1,00, 0,02 – 0,32 e 0,10 – 2,00, respectivamente 74

Capítulo 2:

Tabela 1. Tratamentos realizados com as linhagens-alvo (*Microcystis wesenbergii* BCCUSP11 e *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232) e extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 (MC+) e BCCUSP03 (MC-). Concentrações de MC totais dos extratos brutos (MC+ e MC-), concentrações iniciais (4^o dia) e finais (14^o dia) de MC obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Porcentagem de decréscimo (-) (para *M. wesenbergii* BCCUSP11) e acréscimo (+) (para *M. aeruginosa* BCCUSP232) da concentração inicial de MC. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. Não se aplica (NA) 95

Sumário

	Página
1. Introdução	19
2. Hipótese	22
3. Objetivos	22
4. Revisão Bibliográfica	23
5. Referências Bibliográficas	35

Capítulo 1: Saxitoxinas potencializam os efeitos alelopáticos de *Cylindrospermopsis raciborskii*

1. Resumo	45
2. Introdução	46
3. Material e Métodos	48
3.1. Linhagens utilizadas e condições de cultivo	48
3.2. Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias	48
3.3. Determinação da concentração de saxitoxinas nos extratos brutos	48
3.4. Preparação do extrato bruto aquoso e adição de SX nos cultivos	49
3.5. Desenho experimental	49
3.6. Cálculo da densidade celular	50
3.7. Determinação da concentração de cianotoxinas dos cultivos	50
3.8. Análise estatística	51
4. Resultados	52
5. Discussão	54
6. Referências Bibliográficas	58
7. Anexos	62

Capítulo 2: Efeitos distintos de extratos brutos com presença e ausência de microcistinas em duas linhagens de *Microcystis*.

1. Resumo	76
2. Introdução	77
3. Material e Métodos	79

3.1. Linhagens utilizadas e condições de cultivo	79
3.2. Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias	79
3.3. Determinação da concentração de MC no extrato MC+	79
3.4. Preparação do extrato bruto aquoso e adição de MC nos cultivos	80
3.5. Desenho experimental	80
3.6. Cálculo da densidade celular	80
3.7. Determinação da concentração de MC dos cultivos	81
3.8. Análise estatística	81
4. Resultados	82
5. Discussão	83
6. Referências Bibliográficas	88
7. Anexos	92

1 Introdução

As cianobactérias são organismos procariontes, ou seja, não possuem núcleo individualizado nem organelas membranosas. Elas possuem clorofila-a como principal pigmento fotossintetizante, e ficobilinas como pigmentos acessórios (Komárek e Anagnostidis, 2005). Por fazerem fotossíntese, esses organismos liberam oxigênio como resultado da fixação do gás carbônico, e por isso possuem grande importância na produção primária dos ecossistemas onde ocorrem. Além disso, algumas espécies desenvolveram a capacidade de fixar nitrogênio através de células especializadas chamadas heterócitos (Wehr e Sheath, 2003), ou seja, as cianobactérias são de extrema importância para a incorporação do nitrogênio nas cadeias alimentares.

O surgimento das cianobactérias no planeta ocorreu a cerca de 3,5 bilhões de anos, justamente quando apareceram os primeiros seres vivos fotossintetizantes (Garcia-Pichel, 2009). Com várias adaptações morfológicas e fisiológicas desde então, a distribuição desses organismos é muito ampla. Porém, a maior parte das espécies ocorre no ambiente aquático, compondo as comunidades perifíticas e fitoplanctônicas de ambientes marinhos e dulciaquícolas (Komárek e Anagnostidis, 2005; Reviere, 2006).

Em determinadas condições ambientais pode ocorrer uma floração de cianobactérias, um fenômeno no qual esses organismos se multiplicam descontroladamente e dominam a comunidade fitoplanctônica (Chorus e Bartram, 1999). A floração pode ser danosa para o ambiente, inclusive para o ser humano, pois muitas espécies de cianobactérias possuem a potencialidade de produzir cianotoxinas. Essas substâncias são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias que desencadeiam efeitos nocivos em células, tecidos ou organismos (Charmichael, 1992). De acordo com seus efeitos tóxicos em mamíferos, elas são classificadas como hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neutotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (S) e saxitoxinas), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lipopolissacarídeos) (Chorus e Bartram, 1999; Labine e Minuk, 2009; Araóz, 2010).

As microcistinas (MC) são as cianotoxinas mais estudadas (Figura 1A), possuindo cerca de 80 variantes (Falconer e Humpage, 2005). Elas são inibidoras das proteína-fosfatases 1 e 2A, o que provoca o desarranjo do citoesqueleto dos hepatócitos e hemorragia intra-hepática (Mackintosh et al, 1990), podendo atuar também como promotoras de tumores (Falconer, 1991). Essas moléculas também parecem modificar o metabolismo das auxinas em vegetais (Kurki-Helasma e Meriluoto, 1998). Já a saxitoxina (SX) (Figura 1B) apresenta a maior toxicidade para mamíferos, com LD₅₀ de 10µg.Kg⁻¹ (Chorus & Bartram, 1999), e possui cerca de 57 análogos (Wiese et al, 2010). Ela atua bloqueando os canais de sódio da membrana plasmática dos neurônios, impedindo assim a condução de impulsos elétricos (Aráoz et al, 2010).

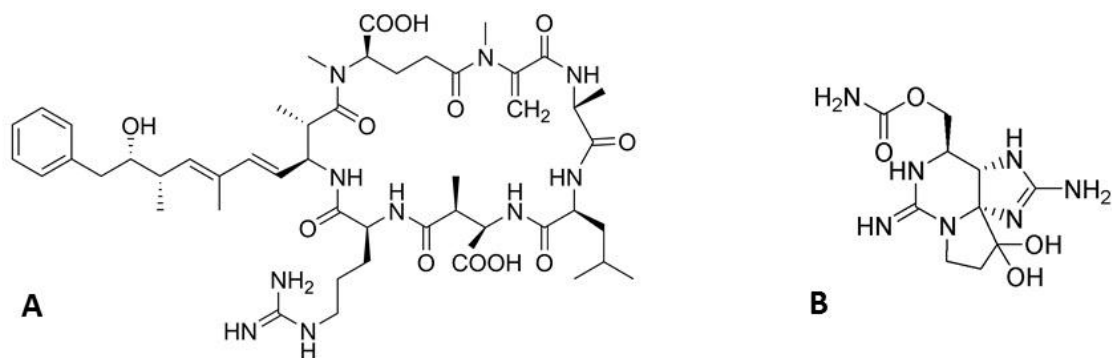


Figura 1: Estrutura molecular da microcistina-LR, a variante mais conhecida das microcistinas (A); e da saxitoxina (B).

Embora muitos estudos apontem para os perigos das cianotoxinas para a agropecuária (Chen, 2004; Saqrane et al, 2009; Kittler et al, 2012) e saúde humana (Jochimsen et al, 1998; Ledreux et al, 2010; Metcalf et al, 2012), o papel ecológico das cianotoxinas ainda é desconhecido e muito debatido (Gross, 2003). Em relação às MC, já foi proposto que elas possam atuar como defensivos químicos (Charmichael, 1992), no transporte de ferro no interior da célula (Ütkilen e Gjølme, 1995), reguladoras de crescimento populacional (Sedmak e Kosi, 1998) ou moléculas que aumentam a vida útil de proteínas (Zilliges et al, 2011). Em relação às SX, embora os efeitos tóxicos em mamíferos e alguns invertebrados estejam elucidados, as funções intracelulares e/ou outros papéis ecológicos ainda são desconhecidos (Wiese et al, 2010).

Alguns fatores abióticos, como pH alcalino, baixa movimentação da coluna d'água, temperatura da água acima de 24°C, e principalmente o aumento da concentração de nitrogênio e fósforo em um ecossistema aquático, favorecem o desenvolvimento das cianobactérias (Chorus e Bartram, 1999; Chellappa e Costa, 2003; Sotero-Santos et al, 2008; Fernandes et al, 2009). Porém, mais recentemente, alguns autores passaram a analisar a possibilidade da colaboração de alguns fatores bióticos para que essa dominância seja estabelecida, como a produção de metabólitos secundários com caráter alelopático (Schaeferl et al, 2002; Gross, 2003; Figueiredo et al, 2007).

Nesse contexto, existem vários trabalhos que levantam a hipótese das cianotoxinas atuarem como compostos alelopáticos (Schagerl et al, 2002; Pflugmacher, 2002; Leflaive e Ten-Hage, 2007). Segundo Rice (1984), a alelopatia consiste em um conjunto de interações bioquímicas, estimulantes ou inibitórias, entre bactérias, algas, fungos ou plantas em um organismo alvo. Assim, ao atuar como compostos alelopáticos, as cianotoxinas poderiam tanto favorecer a reprodução das cianobactérias produtoras como inibir o crescimento de outros organismos fitoplanctônicos, o que auxiliaria no estabelecimento da dominância e até mesmo de florações de cianobactérias.

Já existem estudos sobre alelopatia envolvendo cianotoxinas, principalmente MC, e organismos fotoautotróficos aquáticos, como macrófitas aquáticas (Pflugmacher, 2002; 2004; Esterhuizen-Londt et al, 2011; Jiang et al, 2012) e microalgas (Kearns e Hunter, 2000; Suikkanen et al, 2006; Vassilakaki e Pflugmacher, 2008; Hattenrath-Lehmann e Gobler, 2011; B-Béres et al, 2012). Todos os trabalhos acima utilizaram concentrações de cianotoxinas maiores do que as geralmente são encontradas na natureza.

Porém, segundo Babica et al (2006), trabalhos sobre alelopatia com MC são muito controversos, pois há diferenças importantes nas metodologias (tempo de exposição à toxina, a forma como ela é aplicada nas culturas (extrato, filtrado ou purificada) e linhagens-alvo diversas), sendo que poucos abordaram concentrações normalmente encontradas na natureza, ou seja, até 10µg.L⁻¹. Por isso, ao simular condições ambientais com concentrações muito altas de MC, os autores desses trabalhos podem ter concluído sobre a presença de efeitos alelopáticos produzidos

por MC (Leão et al, 2009a). O mesmo pode ser extrapolado para as SX, pois mesmo com os poucos trabalhos que abordaram o possível caráter alelopático dessa cianotoxina (Fistarol, 2004; Hattenrath-Lehmann e Gobler, 2011), as concentrações utilizadas geralmente são mais altas do que é normalmente registrado nos ecossistemas aquáticos. Em vista disso, são necessários estudos sobre os possíveis efeitos alelopáticos dessas substâncias com concentrações até $10\mu\text{g.L}^{-1}$.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo geral analisar os efeitos alelopáticos causados por MC e SX no crescimento de microalgas e cianobactérias, em concentrações normalmente encontradas na natureza (até $10\mu\text{g.L}^{-1}$).

2 Hipótese

Há trabalhos que registraram efeitos alelopáticos causados por SX e MC, mas as concentrações normalmente utilizadas estão acima do que é ambientalmente relevante. Portanto, nossa hipótese é que concentrações de SX e MC próximas às encontradas normalmente em ambientes aquáticos não exercem efeitos alelopáticos sobre as espécies fitoplanctônicas.

3 Objetivos

- Verificar os possíveis efeitos alelopáticos de SX, em diferentes concentrações próximas às encontradas na natureza, sobre o crescimento das microalgas verdes *Monoraphidium convolutum*, *Scenedesmus acuminatus* e das cianobactérias *Microcystis wesenbergii* e *M. aeruginosa*.
- Verificar os possíveis efeitos alelopáticos de MC, em diferentes concentrações próximas às encontradas na natureza, sobre o crescimento das cianobactérias *Microcystis wesenbergii* e *M. aeruginosa*.
- Investigar se os extratos brutos de linhagens de cianobactérias tóxicas e não-tóxicas exercem o mesmo efeito alelopático sobre o crescimento das linhagens-alvo supracitadas.

4 Revisão Bibliográfica

O principal foco dos estudos sobre alelopatia em geral envolveram organismos fotossintetizantes terrestres, devido ao potencial de utilização de compostos alelopáticos na melhoria da agricultura (Anaya, 1999). Esses estudos visaram identificar efeitos benéficos de substâncias com caráter alelopático para o crescimento e aumento da qualidade de produção de vários tipos de culturas vegetais. É válido lembrar que muitas culturas utilizam sistemas de irrigação que captam água diretamente de mananciais e/ou reservatórios. Se por ventura essas fontes de água contiverem cianobactérias, há um risco de submeter plantas terrestres à substâncias produzidas por cianobactérias (inclusive cianotoxinas), as quais podem provocar algum tipo de efeito nos vegetais. Esse risco aumenta quando há floração de cianobactérias na fonte de água, pois assim a produção desses compostos é maior devido à grande biomassa desses micro-organismos.

Como existe uma alta demanda da utilização de água para irrigação de culturas vegetais, há vários estudos que pesquisaram os efeitos alelopáticos provocados por cianotoxinas e/ou extratos de cianobactérias em plantas terrestres. A maioria utilizou MC, e abordaram a inibição da fotossíntese (Abe et al, 1996), efeitos no crescimento da planta (McElhiney et al, 2001), registro de estresse oxidativo (Pflugmacher et al, 2007; Stüven e Pflugmacher, 2007; Peuthert e Pflugmacher, 2010; Chen et al, 2012), inibição de crescimento e promoção de estresse oxidativo (Kurki-Helasma e Meriluoto, 1998; Chen et al, 2004), efeitos na germinação e crescimento (Saqrane et al, 2008; Wang et al, 2011), promoção de danos celulares diversos (Yin et al, 2006; Peuthert et al, 2007; Huang et al, 2008; Máthé et al, 2009; Chen et al, 2011) e efeitos negativos no desenvolvimento e metabolismo vegetal (Saqrane et al, 2009). Poucos trabalhos abordaram a alelopatia provocada por cilindropermopsina, sendo registrados danos celulares (Metcalf et al, 2004; Beyer et al, 2009), efeitos na germinação e crescimento (Silva e Vasconcelos, 2010), inibição de crescimento e estresse oxidativo (Pietro et al, 2011) e bioacumulação (Kittler et al, 2012). Não foram encontrados estudos abordando efeitos alelopáticos em plantas terrestres provocados por saxitoxinas.

Para que as culturas de vegetais terrestres tenham acesso às substâncias alelopáticas produzidas por cianobactérias, é necessário que a água seja levada até eles através da irrigação. Ou seja, a interação aleloquímica entre cianobactérias e plantas ocorre principalmente por conta da atividade antrópica, não sendo algo natural. Portanto, se as cianobactérias fitoplanctônicas gastam energia para produzir compostos alelopáticos, os verdadeiros organismos-alvo dessas substâncias devem viver nos ecossistemas aquáticos.

Nesse contexto, existem estudos que focaram a alelopatia cianobacteriana principalmente em organismos aquáticos autotróficos, ou seja, macrófitas aquáticas e organismos fitoplanctônicos. Em relação às macrófitas aquáticas, mais uma vez, a maior parte dos trabalhos utilizou MC como composto alelopático, e investigou alterações gerais no metabolismo vegetal (Pflugmacher et al, 1999), inibição no crescimento (Romanowska-Duda e Tarkzynska, 2002; Yin et al, 2005), inibição da fotossíntese (Pflugmacher, 2002), promoção de estresse oxidativo (Pflugmacher, 2004; LeBlanch et al, 2005; Jiang et al, 2012), bioacumulação seguida de estresse oxidativo (Mitrovic et al, 2005; Wang et al, 2012) e diminuição de peso seco e número de folhas (Jang et al, 2007). As macrófitas aquáticas também foram alvos de estudos com outras cianotoxinas, como a promoção de estresse oxidativo por anatoxina-a (Mitrovic et al; 2004) e beta-N-metilamino-L-alanina – BMAA (Esterhuizen-Londt et al, 2011), além da inibição do crescimento por cilindrospermopsina (Kinneer et al, 2008).

A alelopatia de compostos produzidos por cianobactérias (inclusive cianotoxinas) em organismos fitoplanctônicos foi abordada de diferentes maneiras. Existem trabalhos que utilizaram substâncias purificadas, enquanto outros utilizaram filtrados ou extratos de cianobactérias potenciais produtoras de substâncias alelopáticas. Além disso, os organismos-alvo são muito variados, pertencentes a diferentes habitats e grupos taxonômicos, sendo cultivados em laboratório de forma isolada ou juntamente com outros organismos fitoplanctônicos em microcosmos. Em relação às cianotoxinas, embora existam trabalhos com saxitoxinas, nodularina e anatoxina-a, a maioria dos estudos envolveram a MC, principalmente a variante – LR, em concentrações muito diversas e muitas vezes acima de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ (ou seja,

acima do que é encontrado normalmente em ambientes aquáticos sem florações de cianobactérias).

Os efeitos das MC sobre o crescimento de organismos fitoplanctônicos já foram bastante investigados, e os estudos mostraram que não há um padrão de resposta alelopática frente à essa cianotoxina. Efeitos alelopáticos estimulatórios provocados por MC já foram descritos pelos trabalhos de Sedmak e Kosi (1998), que registraram aumento do conteúdo de clorofila-a de *M. aeruginosa* e das microalgas verdes *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komàrková-Legnerová e *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson na presença de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR; e El Sheekh et al (2010), que reportaram o aumento da densidade celular e do conteúdo de clorofila-a das cianobactérias *Oscillatoria angustissima* West e West e *Anabaena* sp. e da microalga verde *Chlorella vulgaris* Beijerinck, ao utilizarem um filtrado oriundo do cultivo de *M. aeruginosa* produtora de MC.

Ou et al (2005) cultivaram a crisofícea *Poterioochromonas* sp. em meio de cultura contendo MC-LR e MC-RR em concentrações variando entre 100 e $4.000\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores relataram que essa alga teve seu crescimento estimulado em cerca de 5 vezes em relação ao controle na maior concentração, sendo que as duas variáveis de MC causaram o mesmo tipo de efeito. Além disso, esses autores registraram que *Poterioochromonas* é capaz de biodegradar a MC, o que mostra a importância desse gênero para a redução da concentração de MC no ambiente aquático. Porém, é válido ressaltar que esses três estudos utilizaram concentrações de MC muito acima do que é encontrado em ambientes sem florações de cianobactérias.

A inibição do crescimento de linhagens-alvos pela MC foi registrada pelos estudos de Sedmak e Kosi (1998), Kearns e Hunter (2000), Babica et al (2007) e El-Sheekh et al (2010). Dentre eles, apenas Kearns e Hunter (2000), utilizaram concentração de MC ambientalmente relevante, ao submeterem cultivos da microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard a $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC purificada. Houve redução do crescimento da microalga verde nos últimos dias do experimento. Eles concluíram que a MC pode ser utilizada por seu produtor para melhorar o seu poder competitivo contra outros organismos fitoplanctônicos,

podendo causar uma mudança na composição fitoplanctônica ao desfavorecer o crescimento de microalgas verdes.

Sedmak e Kosi (1998) chegaram a uma conclusão semelhante ao estudo de Kearns e Hunter (2000), porém utilizando concentrações acima de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR. Eles cultivaram isoladamente linhagens de organismos fitoplanctônicos em meio contendo a toxina purificada, a qual inibiu o crescimento de *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, *Coelastrum microporum* Nägeli e da criptofíceia *Cryptomonas erosa* Ehrenberg. Já El-Sheekh et al (2010) submeteram os cultivos das cianobactérias *Oscillatoria angustissima* e *Anabaena* sp. e das microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* (Türpin) Kützing e *Chlorella vulgaris* a um filtrado e a um extrato bruto de *M. aeruginosa* produtora de MC. O filtrado inibiu o crescimento de *S. obliquus*, enquanto o extrato, com quatro concentrações de MC (25, 50, 100 e 200mg.L^{-1}) inibiu o crescimento das quatro linhagens-alvo. Os autores dizem que a MC é a responsável pelos efeitos alelopáticos observados, porém não comentam o fato de terem utilizando concentrações muito altas de MC.

Com experimentos semelhantes, Babica et al (2007) cultivaram *M. aeruginosa* e cinco linhagens de clorofíceas em presença de MC-RR ou MC-LR com concentrações entre 1 e $25.000\mu\text{g.L}^{-1}$. A presença das toxinas em até $10\mu\text{g.L}^{-1}$ não afetou o crescimento das linhagens. As clorofíceas *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindák e *Chlamydomonas reinhardtii* sofreram inibição a partir de $1.000\mu\text{g.L}^{-1}$ com 11 dias de experimento. Essas linhagens, juntamente com as microalgas verdes *Chlorella kesslerii* Fott e Nováková, *Pediastrum duplex* Meyen e *Scenedesmus quadricauda* foram inibidas na concentração mais alta de MC. Por isso, esses autores afirmam que as MC não são capazes de impedir o crescimento de organismos fitoplanctônicos em concentrações normalmente encontradas na natureza, colocando em cheque as conclusões de Kearns e Hunter (2000) e El-Sheekh et al (2010).

Dois trabalhos são mais taxativos e indicam que as MC não possuem caráter alelopático. Oberhaus et al (2008) utilizaram filtrados de três linhagens da cianobactéria *Planktothrix rubescens* (De Candolle ex Gomont) Anagnostidis e Komárek produtoras de MC, isoladas de ambientes diferentes, em cultivos da microalga verde filamentosa *Mongeotia gracilima* (Hass.) Wittrock e duas linhagens

de *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis e Komárek. Uma das linhagens de *P. rubescens* provocou efeitos inibitórios no crescimento dos três organismos-alvos, enquanto linhagens isoladas de outro lago não provocaram nenhum tipo de efeito. Os autores concluíram que a MC não está relacionada com o efeito alelopático, pois linhagens produtoras de MC com origens distintas não promoveram o mesmo tipo de resposta. Ou seja, uma mesma espécie pode provocar efeitos alelopáticos ou não, dependendo de sua origem geográfica, constituição genética e das substâncias que produz.

B-Beres et al (2012) perceberam que em comunidades fitoplanctônicas equilibradas (Steady-State) não há coexistência de cianobactérias e criptofíceas, e levantaram a hipótese de que a produção de MC poderia favorecer as cianobactérias. Então *Cryptomonas ovata* Ehrenberg foi cultivada em presença de células vivas, extrato bruto de *M. aeruginosa* e MC-LR purificada a $1\mu\text{g.L}^{-1}$. *C. ovata* foi inibida em todos os tratamentos, com inibição mais potente na presença das células vivas de *M. aeruginosa*. Por isso, esses autores sugerem que as MC não desempenham função alelopática entre essas duas espécies.

Ainda em relação a MC, existem estudos que abordam outros tipos de respostas alelopáticas que não o estímulo ou inibição do crescimento das linhagens-alvo. Por exemplo, Pietsch et al (2001), Hu et al (2005) e Vassilakaki e Pflugmacher (2008) investigaram a promoção do estresse oxidativo pela presença da MC. Pietsch et al (2001) obtiveram o extrato bruto de uma amostra ambiental com floração de cianobactérias e compararam os efeitos causados por esse extrato e MC purificadas sobre a microalga verde *Scenedesmus armatus* (Chodat) G. M. Smith e *Ceratophyllum demersum* L., uma macrófita aquática. O extrato causou maior estresse oxidativo em *S. armatus*, além de inibição parcial da fotossíntese nos dois organismos-alvo. Por isso, os autores salientam que os extratos brutos simulam melhor as condições ambientais ocorrentes nos ecossistemas aquáticos, e seus resultados indicam que existem substâncias presentes no extrato que podem agir juntamente com a MC, potencializando o estresse oxidativo.

Porém, Vassilakaki e Pflugmacher (2008) descreveram em seu estudo estresse oxidativo mais intenso ao utilizar a toxina purificada. Eles expuseram uma linhagem da cianobactéria *Synechocystis* sp. à MC purificada e também a um

extrato bruto (com MC) de uma amostra ambiental contendo floração de *Aphanizomenon flos-aquae* Ralf ex Bornet e Flahault e *M. aeruginosa*. O estresse oxidativo foi confirmado através do aumento da atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e glutamina S-transferase solúvel, com resultados mais notórios para a toxina purificada. Os autores afirmam que as MC podem ser utilizadas como ferramenta de comunicação química entre cianobactérias, através da promoção do estresse oxidativo. Por outro lado, Hu et al (2005) sugerem que a MC-RR pode favorecer o desenvolvimento de florações de *Microcystis* ao inibir fisiologicamente outros organismos fitoplanctônicos. Eles cultivaram uma linhagem da cianobactéria *Synechococcus elongatus* (Nägeli) Nägeli em meio de cultura contendo $100\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR e registraram forte inibição no crescimento e aumento significativo de ROS (“reactive oxygen species”), além de elucidarem parte dos mecanismos enzimáticos antioxidativos dessa cianobactéria que são desencadeados pela presença da toxina.

Sedmak e Elersek (2006) abordaram outra forma de alelopatia causada pela MC: a agregação celular e aumento do volume celular. Eles cultivaram uma linhagem da microalga verde *Scenedesmus quadricauda* e quatro linhagens de *Microcystis* em meio contendo aproximadamente $500\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, -RR e -YR, todas purificadas e utilizadas isoladamente. Duas linhagens da cianobactéria e a alga verde sofreram maior agregação celular na presença da toxina. Houve aumento de volume celular e conteúdo de clorofila-a para todos os organismos testes. Os autores não conseguiram explicar a função das MC, mas afirmam que elas causam efeitos específicos em cada organismo fitoplanctônico. Ou seja, determinadas espécies podem ser afetadas pela cianotoxina, enquanto outras se mostram indiferentes à presença de MC, o que pode levar a modificações da estrutura da comunidade fitoplanctônica que favoreçam a dominância de cianobactérias.

Diferentemente da MC, existem poucos estudos que abordam a alelopatia provocada diretamente por SX. Essa neurotoxina é produzida por cianobactérias, como *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon*, assim como por dinoflagelados, principalmente de ambientes marinhos, como *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* (Wiese et al, 2010). Inclusive, existem trabalhos que investigam efeitos alelopáticos causados por substâncias produzidas por *Alexandrium*, sem ser a SX, sobre organismos fitoplanctônicos marinhos, como Tillmann e John (2002) e

Tillmann et al (2008). Além disso, alguns autores, como Fistarol et al (2004), Hattenrath-Lehmann e Gobler (2011) e Perreault et al (2011) não encontraram efeitos alelopáticos provocados por SX em seus experimentos. Fistarol et al (2004), por exemplo, mantiveram uma comunidade fitoplanctônica em laboratório, além de culturas monoalgais da diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell e Hasle e da criptofíceia *Rhodomonas* sp. em meio contendo filtrados de linhagens de *Alexandrium tamarense* (LeBour) Balech produtoras e não produtoras de SX. Em todos os experimentos foi registrada inibição do crescimento das algas por todas as linhagens de *A. tamarense* utilizadas. Logo, os autores concluíram que essa espécie de dinoflagelado não utiliza a SX como composto alelopático, mas é capaz de produzir outras substâncias que tenham esse caráter.

Hattenrath-Lehmann e Gobler (2011) chegaram à mesma conclusão sobre a alelopatia da SX, ao utilizaram cinco linhagens de *Alexandrium fundyense* Balech (sendo quatro produtoras de SX) em cultivos mistos com *Rhodomonas salina* (Wislouch) D. R. A. Hill. Além disso, eles adicionaram os filtrados dessas linhagens sobre o cultivo das diatomáceas *Thalassiosira pseudonana* Hasle e Heimdal e *T. weissflogii* e dos dinoflagelados *Prorocentrum minimum* (Pavillard) J. Schiller e *Heterocapsa arctica* Horigushi. Por fim, cultivaram organismos pertencentes ao gênero *Alexandrium* juntamente com outros organismos fitoplanctônicos em um microcosmo em laboratório. Os autores concluíram que as SX não estão envolvidas nas relações alelopáticas, pois a linhagem de *Alexandrium* não produtora de SX também inibiu o desenvolvimento da comunidade fitoplanctônica. Logo, outras substâncias exportadas pelas células de *Alexandrium* provocaram efeitos alelopáticos descritos.

Embora o foco do estudo de Perreault et al (2011) fosse avaliar a sensibilidade de culturas de células animais e algais com a presença de SX, esses autores obtiveram resultados interessantes sobre a alelopatia da SX sobre o cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* em concentrações entre 0,60 e 3,84 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de SX purificada, avaliando as mudanças no fotossistema II e formação de ROS nas células algais. Foram encontrados efeitos inibitórios apenas nas células animais (neuroblastomas N2A). Os autores afirmam que as concentrações de SX que provocam efeitos em células animais não afetam a comunidade fitoplanctônica.

Porém, Melegari et al (2012) encontrou respostas distintas de Hattenrath-Lehmann e Gobler (2011) e Perreault et al (2011), ao exporem células de *C. reinhardtii* a 0.12, 0.24, 0.45 e 0.90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de SX e quantificarem os níveis de malondialdeído (MDA) nas culturas, um composto resultante da atividade de enzimas anti-oxidativas. Não houve aumento de MDA em nenhum tratamento com *C. reinhardtii*, mas sim mudanças no comportamento de enzimas anti-oxidativas na maior concentração de SX. Os autores concluíram que concentrações acima de 0.90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de SX podem comprometer o funcionamento normal de células algais, favorecendo o crescimento do organismo produtor de SX.

Além de MC e SX, existem trabalhos que investigam os possíveis efeitos alelopáticos provocados por anatoxina-a (ANA) e nodularina (NOD). Kearns e Hunter (2000) encontraram efeitos alelopáticos no crescimento de *C. reinhardtii* provocados por MC, como dito anteriormente, mas não registraram nenhum tipo de resposta alelopática dessa microalga verde frente à ANA. Suikkanen et al (2004) testaram os efeitos alelopáticos de filtrados das cianobactérias *Nodularia spumigena* Mertens (produtora de NOD, uma hepatotoxina), *Aphanizomenon flos-aquae* e *Anabaena lemmermanni* P. Ritcher em cultivos da diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, da criptofíceia *Rhodomonas* sp. e da haptofíceia *Prymnesium parvum* N. Carter. *Rhodomonas* sp. foi inibido por todos os filtrados, ao passo que *P. parvum* não sofreu efeito alelopático. Os autores ressaltam que a alelopatia não parece estar relacionada à produção de hepatotoxinas, e que diferentes espécies podem responder de formas distintas frente a um mesmo organismo produtor de substâncias alelopáticas.

A fim de comprovar que a NOD não causa efeitos alelopáticos, Suikkanen et al (2006) investigaram os efeitos de filtrados de duas cianobactérias produtoras de NOD (*Nodularia spumigena* e *Aphanizomenon flos-aquae*), e também da NOD purificada, sobre a densidade celular, conteúdo de clorofila e a captação de CO_2 de uma cultura de *Rhodomonas* sp. Houve inibição de todos os parâmetros medidos apenas pelos dois filtrados, sendo que não houve resposta frente à nodularina purificada. Logo, os autores concluíram que essa cianotoxina não está envolvida em relações alelopáticas, embora reconheçam que a cianotoxina seja incorporada pelas células de *Rhodomonas* sp.

Outras substâncias produzidas por cianobactérias podem provocar efeitos alelopáticos em seres fitoplanctônicos. Um estudo que merece destaque é o de Leão et al (2012), que expuseram, em laboratório, uma comunidade fitoplânctonica dominada por morfotipos de *Microcystis* a um exudato contendo $1,7\text{mg.L}^{-1}$ de portoamidas A, B, C e D (substâncias com função alelopática) de uma linhagem de *Oscillatoria*. Eles realizaram análises da taxa de crescimento das espécies e perfizeram uma PCR-DGGE (análise que afere os genótipos dos organismos presentes em uma comunidade). As portoamidas inibiram o crescimento de um morfotipo de *Microcystis*, da diatomácea *Synedra* e algumas clorofíceas. A PCR-DGGE mostrou que houve favorecimento de um genótipo de *Microcystis* após a exposição aos aleloquímicos. O uso da técnica molecular evidenciou um impacto na comunidade fitoplanctônica estudada que não seria possível detectar apenas com as análises microscópicas, mostrando assim que compostos alelopáticos podem afetar também a diversidade genética.

Finalmente, há também alguns estudos que não caracterizam as substâncias causadoras da alelopatia envolvendo cianobactérias, embora descrevam os efeitos causados nos organismos-alvo. Por exemplo, Figueiredo et al (2007) realizaram um experimento onde foi avaliada a inibição da fotossíntese por exudatos de culturas de *C. raciborskii* e de uma amostra ambiental, adicionando-os ao cultivo de várias linhagens de microalgas isoladas do mesmo ambiente aquático. A fotossíntese de *M. aeruginosa* e *Coelastrum sphaericum* Nägeli foi inibida pelos dois exudatos, enquanto a de *Monoraphidium contortum* foi inibida apenas pelo exudato da cultura de *C. raciborskii*. Os autores concluíram que o uso de substâncias alelopáticas parece ser um mecanismo importante no estabelecimento da dominância de *C. raciborskii* em ecossistemas aquáticos de média latitude.

Outros dois trabalhos abordaram a alelopatia provocada por *C. raciborskii*, porém sem identificar as substâncias responsáveis pelas respostas obtidas. Leão et al (2009b) utilizaram filtrado de 22 linhagens de cianobactérias em cultivos das microalgas verdes *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs e *Chlorella vulgaris*. O filtrado de uma linhagem não tóxica de *C. raciborskii* provocou, inicialmente, um aumento no crescimento seguido de queda na taxa de crescimento de *A. falcatus*. *C. vulgaris* foi inibida apenas pelo filtrado de *Oscillatoria* sp. Os autores concluíram que,

quando as cianobactérias estão em baixas densidades celulares, a alelopatia não parece ser um mecanismo competitivo importante.

Com outro foco, Mello et al (2012) procuraram mostrar o papel da alelopatia na alternância de dominância da comunidade fitoplanctônica entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Eles submeteram cultivos de *M. aeruginosa* a filtrados de monoculturas de *C. raciborskii* e também de cultivos mistos das duas cianobactérias. Houve maior inibição do crescimento de *M. aeruginosa* na presença do filtrado do cultivo misto, sugerindo que a produção de substâncias alelopáticas é intensificada quando *C. raciborskii* entra em competição com outro organismo fitoplanctônico. Além disso, os autores relatam maior agregação celular em *M. aeruginosa*, o que pode ser um mecanismo de defesa frente às substâncias alelopáticas produzidas por *C. raciborskii*.

Efeitos inibitórios sobre organismos fitoplanctônicos provocados por substâncias não identificadas e produzidas por cianobactérias foram descritos por Schagerl et al (2002) e Neisch et al (2012). Schagerl et al (2002) realizaram um experimento em meio sólido contendo substâncias produzidas por 13 linhagens de cianobactérias como fonte de aleloquímicos. Foram cultivados organismos das Classes Cyanophyceae, Chlorophyceae, Bacillariophyceae e Zygnemaphyceae. Houve inibição do crescimento de todos os organismos por *Anabaena torulosa* Lagerheim ex Françoise & Flahault, ao passo que *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Nostoc* provocaram inibição em apenas algumas linhagens-alvo. Os autores salientam que seria importante aumentar o número de estudos sobre substâncias alelopáticas produzidas por cianobactérias para que essas possam ser utilizadas como meio de controlar a população de determinadas espécies fitoplanctônicas em manejos de qualidade da água.

Neisch et al (2012) hipotetizaram que cianobactérias seriam capazes de inibir o crescimento da haptófita *Prymnesium parvum* através da produção de substâncias alelopáticas. Para testar sua hipótese, eles cultivaram uma linhagem de *P. parvum* e a submeteram a um filtrado de uma cultura senescente de *Anabaena* sp e também a um filtrado de um lago onde não havia ocorrência de *P. parvum*. A haptófita foi inibida pelos dois tipos de filtrados, mas ao contrário do que os autores esperavam, a maior inibição foi registrada para o filtrado do lago. A explicação é que *Anabaena*

sp. poderia ter liberado uma grande quantidade de compostos de carbono orgânico, o que estimulou o crescimento de bactérias que servem de alimento para *P. parvum*. Os autores concluíram que as interações entre cianobactérias e haptófitas parecem ser mais complexas e exigem mais estudos para maior aprofundamento.

Por fim, os trabalhos de Suikkanen et al (2005) e Figueiredo et al (2011) registraram tanto efeitos alelopáticos inibitórios quanto estimulatórios em seus resultados, provocados por substâncias não identificadas. Suikkanen et al (2005) cultivaram uma comunidade fitoplanctônica de ambiente salobro e adicionaram filtrados das cianobactérias *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon* sp. e *Anabaena* sp., monitorando a concentração de clorofila-a e a densidade celular. Os filtrados estimularam o crescimento das cianobactérias *Snowella* spp., *Aphanizomenon* sp., *Anabaena* spp. e *N. spumigena*, além da clorófita *Oocystis* sp. e do dinoflagelado *Amphidinium* sp. Por outro lado, inibiram o crescimento de criptofíceas, mostrando que os compostos liberados por essas cianobactérias podem ter efeitos distintos em diferentes espécies.

Figueiredo et al (2011) expuseram as clorofíceas *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Pandorina morum* (Müller) Bory e *Coelastrum astroideum* De Notaris aos filtrados de várias linhagens das cianobactérias *Aphanizomenon gracile* (Lemmermann) Lemmermann, *Aphanizomenon issatschenkoi* (Usačev) Proškina-Lavrenko e *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Horecká por 96h. Uma linhagem de *A. gracile* inibiu o crescimento das quatro clorofíceas, enquanto *A. aphanizomenoides* inibiu apenas *P. subcapitata* e *A. issatschenkoi* inibiu somente *P. morum*. Apenas uma linhagem de *A. gracile* provocou efeito estimulatório (em *C. astroideum*). Os compostos responsáveis pelos resultados não foram identificados. Os autores salientam que os efeitos alelopáticos na comunidade fitoplanctônica podem ser diferentes dependendo da espécie e constituição genética do organismo dominante em um bloom de cianobactérias.

Como mostram os trabalhos abordados acima, não há um consenso sobre a alelopatia de cianobactérias e cianotoxinas, uma vez que há uma diversidade de respostas obtidas frente a uma mesma substância ou espécie de cianobactéria. Mesmo sendo um tema recente, com a maioria dos trabalhos desenvolvidos no século XXI, já há um grande número de trabalhos que abordam os possíveis efeitos

causados por MC. Ainda assim não é possível generalizar a sua função alelopática. O mesmo pode se dizer para as outras cianotoxinas, mesmo que haja um número menor de estudos. Logo é necessário aumentar o número de pesquisas sobre possíveis efeitos alelopáticos causados por outras cianotoxinas que não a MC.

Vários fatores contribuem para que não haja uma uniformidade de respostas sobre a alelopatia de cianotoxinas: primeiramente, os experimentos utilizam concentrações muito diversas e muitas vezes acima do que é normalmente encontrado nos ambientes, o que dificulta a comparação de resultados. Além disso, existe uma grande variedade de organismos-alvo pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, sendo que algumas vezes a mesma espécie responde de maneiras diferentes frente às substâncias alelopáticas. A forma como a toxina é utilizada nos experimentos também é variável, e resulta em diferentes extrapolações para o ambiente aquático. O uso das toxinas purificadas permite conhecer as respostas dos organismos-alvo provocadas exclusivamente por essas substâncias, porém não se aproximam da dinâmica dos ecossistemas aquáticos, pois nesses ambientes as substâncias não se encontram isoladas. Por outro lado, o uso de extratos ou filtrados em cultivos das linhagens-alvo simulam mais fielmente o que ocorre no ambiente aquático, mas dificulta a identificação da(s) substância(s) que promove(m) as respostas alelopáticas. Não há também uma uniformidade de tempo de exposição aos aleloquímicos.

Portanto, mesmo com vários estudos abordando a alelopatia de cianotoxinas, ainda não há um consenso na comunidade científica. Por isso, é necessário que sejam feitos mais trabalhos sobre o tema, principalmente utilizando concentrações normalmente encontradas na natureza e que não descartem a participação de outras substâncias, além das cianotoxinas, produzidas pelas cianobactérias.

5 Referências Bibliográficas

ABE, T.; LAWSON, T.; WEYERS, J. D. B.; CODD, G. A. (1996). Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. **New Phytologist**. Vol. 133. p. 631 – 638.

ANAYA, A. L. (1999). Allelopathy as a Tool in the Management of Biotic Resources in Agroecosystems, **Critical Reviews in Plant Sciences**. Vol. 18. p. 697 – 739.

ARAÓZ, R.; MOLGÓ, J.; MARSAC, N. T. (2010). Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**. Vol. 56. 813 – 828.

B-BÉRES, V.; GRIGORSZKY, I.; VASAS, G.; BORICS, G.; VÁRBÍRÓ, G.; NAGY, S. A.; BORBÉLY, G.; BACSI, I. (2012). The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages? **Hydrobiologia**. Vol. 691. p. 97-107.

BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, Vol. 42. p. 9 – 20.

BABICA, P.; HILSCHEVA, K.; BARTOVA, K.; BLAHA, L.; MARSALEK, B. (2007). Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. **Phycologia**. Vol. 46. p. 137 – 142.

BEYER, D.; SURÁNYI, G.; VASAS, G.; ROSNIK, J.; ERDÖLI, F.; M-HAMVAS, M.; BACSI, I.; BÁTORI, R.; SERFÖZÖ, Z.; SZIGETI, Z. M.; VEREB, G.; DEMETER, Z.; GONDA, S.; MÁTHÉ, C. (2009). Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. **Toxicon**. Vol. 54. p. 440 – 449.

CARMICHAEL, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**. Vol. 72. p. 445 – 459.

CHELLAPPA, N. T.; COSTA, M. A. M. (2003). Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a Eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologica**. Vol. 24. p. 3 - 10.

CHEN, J.; SONG, L.; DAI, J.; GAN, N.; LIU, Z. (2004). Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). **Toxicon**. Vol. 43. p. 393 – 400.

CHEN, J. Z.; YE, J. Y.; ZHANG, H. Y.; JIANG, X. J.; ZHANG, Y. X.; LIU, Z. L. (2011). Freshwater toxic cyanobacteria induced DNA damage in apple (*Malus pumila*), rape (*Brassica napus*) and rice (*Oryza sativa*). **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 190. p. 240 – 244.

CHEN, J.; ZHONG, Y. M.; ZHANG, H. Q.; SHI, Z. Q. (2012). Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in microcystin-LR-induced oxidative stress in *Brassica rapa*. **Water Air Soil Pollut.** Vol. 223. p. 4141 – 4152.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) (1999). **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London. E&FN Spon. 416p.

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; EL-SHENODY, R. A. (2010). Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. **Allelopathy Journal**. Vol. 26. p. 275 – 290.

ESTERHUIZEN-LONDT, M.; PFLUGMACHER, S.; DOWNING, T. G. (2011). The effect of beta-n-methylamino-l-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. **Toxicon**. Vol. 57. p. 803 – 810.

FALCONER, I. R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of Cyanobacteria. **Environmental Toxicology and Water Quality**. Vol. 6. p. 177 - 184.

FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. (2005). Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **International Journal of Environmental Research in Public Health**. Vol. 2. p. 43 – 50.

FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B.; SOUZA, B. D. (2009). Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e conseqüências das florações. **Oecologia Brasiliensis**. Vol. 13. p. 247 – 258.

FIGUEIREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**. Vol. 43. p. 256 – 265.

FIGUEIREDO, D. R.; GONÇALVES, A. M. M.; CASTRO, B. B.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, M. J.; CORREIA, A. (2011). Differential inter- and intra-specific responses of *Aphanizomenon* strains to nutrient limitation and algal growth inhibition. **Journal of Plankton Research**. Vol. 33. p. 1606 – 1616.

FISTAROL, G. O.; LEGRAND, C.; SELANDER, E.; HUMMERT, C.; STOLTE, W.; GRANALI, E. (2004). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. **Aquatic Microbial Ecology**. Vol. 35. p. 45 – 56.

GARCIA-PICHEL, F. (2009). **Cyanobacteria**. p. 107 – 124. In: Schaechter, M. (Ed.) **Encyclopedia of Microbiology**, 3rd Edition, Academy Press, San Diego.

GROSS, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Vol. 22. p. 313 – 339.

HATTENRATH-LEHMANN, T. K.; GOBLER, C.J. (2011). Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: Evidence from field experiments, laboratory experiments, and bloom events. **Harmful algae**. Vol. 11. p. 106 – 116.

HU, Z. Q.; LIU, Y. D.; LI, D. H.; DAUTA, A. (2005). Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. **Hydrobiologia**. Vol. 534. p.23 – 9.

HUANG, W.; XING, W.; LI, D.; LIU, Y. (2008). Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. **Toxicology in Vitro**. Vol. 22. p. 328 – 337.

JANG, M.; HA, K.; TAKAMURA, N. (2007). Reciprocal allelopathic responses between toxic Cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). **Toxicon**. Vol. 49. 727 – 733.

JIANG, J.; GU, X.; SONG, R.; WANG, X.; YANG, L. (2012). Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 190. p. 188 – 196.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO-FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.; Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 338. p. 873 – 878.

KEARNS, K. D.; HUNTER, M. D. (2000). Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. **Environmental Microbiology**. Vol. 3. p. 291 – 297.

KINNEAR, S. H. W.; FABBRO, L. D.; L. J. DUIVENVOORDEN. (2008). Variable growth responses of Water Thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol. 54. p. 187 – 194.

KITTLER, K.; SCHREINER, M.; KRUMBEIN, A.; MANZEI, S.; KOCH, M.; ROHN, S.; MAUL, R. (2012). Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. **Food Chemistry**. Vol. 133. p. 875 – 879.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (2005). **Cyanoprokariota: 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales**. In: BUDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Orgs). **Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag**. München, Germany. Vol. 19, nº 2. 759p.

KURKI-HELASMO, K.; MERILUOTO, J. (1998). Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. **Toxicon**. Vol. 36. p. 1921 – 1926.

LABINE, M. A.; MINUK, G. Y. (2009). Cyanobacterial toxins and liver disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. Vol. 87. p. 773 – 788.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. (2009a). Allelopathy in freshwater cyanobacteria. **Critical Reviews in Microbiology**. Vol. 35. p. 271 – 282.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. (2009b). Allelopathic activity of cyanobacteria on green algae at low densities. **European Journal of Phycology**. Vol. 44. p. 347 – 355.

LEÃO, P. N.; RAMOS, V.; VALE, M.; MACHADO, J. P.; VASCONCELOS, V. M. (2012). Microbial community changes elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. **Microbiology Ecology**. Vol. 63. p. 85 – 95.

LEBLANC, S.; PICK, F. R.; ARANDA-RODRIGUEZ, R. (2005). Allelopathic effects of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in duckweed, *Lemna gibba* L. **Environmental Toxicology**. Vol. 20. p. 67 – 73.

LEDREUX, A.; THOMAZEAU, S.; CATHERINE, A.; DUVAL, C.; YÉPRÉMIAN, C.; MARIE, A.; BERNARD, C. (2010). Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. **Harmful Algae**. Vol. 10. p. 88 – 97.

LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. (2007). Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**. Vol. 52. p. 199 – 214.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letter**. Vol. 264. p. 187 - 192.

MÁTHÉ, C.; BEYER, D.; ERDÖDI, F.; SERFÖZÖ, Z.; SZÉKVÖLGYI, L.; VASAS, G.; M-HAMVAS, M.; JÁMBRIK, K.; GONDA, S.; KISS, A.; SZIGETI, Z. M.; SURÁNYI, G. (2009). Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. **Aquatic Toxicology**. Vol. 92. p. 122 – 130.

McELHINEY, J.; LAWTON, L. A.; LEIFERT, C. (2001). Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. **Toxicon**. Vol. 39. p. 1411 – 1420.

MELEGARI, S. P.; PERREAULT, F.; MOUKHA, S.; POPOVIC, R.; CREPPY, E. E.; MATIAS, W. G. (2012). Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. **Chemosphere**. Vol. 89. p. 38 – 43.

MELLO, M. M.; SOARES, M. C. S.; ROLAND, F.; LÜRLING, M. (2012). Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of Plankton Research**. Vol. 34. p. 987 – 994.

METCALF, J. S.; BARAKATE, A.; CODD, G. A. (2004). Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. **FEMS Microbiology Letters**. Vol. 235. p. 125 – 129.

METCALF, J. S.; RICHER, R.; COX, P. A.; CODD, G. A. (2012). Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. **Science of the Total Environment**. Vol. 421. p. 118 – 123.

MITROVIC, S. M.; ALLIS, O.; FUREY, A. JAMES, K. J. (2005). Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 61. p. 345 – 352.

MITROVIC, S. M.; PFLUGMACHER, S.; JAMES, K. J.; FUREY, A. (2004). Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. **Aquatic Toxicology**. Vol. 68. p. 185 – 192.

NEISCH, M. T.; ROELKE, D. L.; BROOKS, B. W.; GROVER, J. P.; MASSER, M. P. (2012). Stimulating effect of *Anabaena* sp. (Cyanobacteria) exudates on *Prymnesium parvum* (Haptophyta). **Journal of Phycology**. Vol. 48. p. 1045 – 1049.

OBERHAUS, L.; BRIAND, J.; HUMBERT, J. (2008). Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. **FEMS Microbiology Ecology**. Vol. 66. p. 243 – 249.

OU, D. Y.; SONG, L. R.; GAN, N. Q.; CHEN, W. (2005). Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poterioochromonas* sp. **Environmental Toxicology**. Vol. 20. p. 373 – 380.

PERREAULT, F.; MATIAS, M. S.; MELEGARI, S. P.; PINTO, C. R. S. C.; CREPPY, E. E.; POPOVIC, R.; MATIAS, W. G. (2011). Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 74. p. 1021 – 1026.

PEUTHERT, A.; CHAKRABARTI, S.; PFLUGMACHER, S. (2007). Uptake of microcystins-LR and –LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (Lipid peroxidation). **Environmental Toxicology**. Vol. 22. p. 436 – 442.

PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S. (2010). Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfafa seedlings (*Medicago sativa*). **Toxicon**. Vol. 56. p. 411 – 417.

PFLUGMACHER, S.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W. (1999). Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. **Environmental Toxicology**. Vol. 14. p. 110 – 115.

PFLUGMACHER, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**. Vol. 17. p. 407-413.

PFLUGMACHER, S. (2004). Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**. Vol. 70. p. 169-178.

PFLUGMACHER, S.; AULHORN, M.; GRIMM, B. (2007). Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. **New Phytologist**. Vol. 175. p. 482 – 489.

PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AME, M. V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. (2001). The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environmental Toxicology**. Vol.16. p. 535 – 42.

PRIETO, A.; CAMPOS, A.; CAMEÁN, A.; VASCONCELOS, V. (2011) Effects on growth and oxidative stress status of Rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria

(*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 74. p. 1973 – 1980.

REVIERS, B. (2006). **Biologia e Filogenia das Algas**. Santana. Artmed. 280p.

RICE, E. I. (1984). **Allelopathy**. Academic Press. Orlando.

ROMANOWSKA-DUDA, Z.; TARCZYŃSKA, M. (2002). The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. **Environmental Toxicology**. Vol. 17. p. 434 – 440.

SAQRANE, S.; EL GHAZALI, I.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; VASCONCELOS, V. (2008). Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. **Journal of Environmental Science and Health Part B**. Vol. 43. p. 443 – 451.

SAQRANE, S.; OUAHID, Y.; EL GHAZALI, I.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; DEL CAMPO, F. F. (2009). Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. **Toxicon**. Vol. 53. p. 786 – 796.

SCHAGERL, M.; UNTERRIEDER, I.; ANGELER, D. G. (2002). Allelopathy among Cyanoprokaryota and other algae originating from lake Neusiedlersee (Austria). **Internatiotal Review of Hydrobiology**. Vol. 87. p. 365 – 374.

SEDMAK, B.; ELERŠEK, T. (2006). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. **Microbial Ecology**. Vol. 51. p. 508 – 515.

SEDMAK, B.; KOSI, G. (1998). The role of microcystin in heavy cyanobacterial bloom formation. **Journal of Plankton Research**. Vol. 20. p. 691 – 708.

SILVA, P.; VASCONCELOS, V. (2010). Allelopathic effect of *Cylindrospermopsis raciborskii* extracts on the germination and growth of several plant species. **Chemistry and Ecology**. Vol. 26. p. 263 – 271.

SOTERO-SANTOS, R. B.; CARVALHO, E. G.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. (2008). Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). **Harmful Algae**. Vol. 7. p. 590 – 598.

STÜVEN, J.; PFLUGMACHER, S. (2007). Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. **Toxicon**. Vol. 50. p. 85 – 93.

SUIKKANEN, S.; ENGSTRÖM-ÖST, J.; JOKELA, J.; SIVONEN, K.; VIITASALO, M. (2006). Allelopathy of Baltic Sea cyanobacteria: no evidence for the role of nodularin. **Journal of Plankton Research**. Vol. 28. p. 543 – 550.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. (2004). Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *aphanizomena flos-aquae* and *Anabaena lemmermanni* on algal monocultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Vol. 308. p. 85 – 101.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. (2005). Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. **Marine Ecology Progress Series**. Vol. 287. p. 1 – 9.

TILLMANN, U.; JOHN, U. (2002). Toxic effects of *Alexandrium* spp. On heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defense mechanism independent of PSP-toxin content. **Marine Ecology Progress Series**. Vol. 230. p. 47 – 58.

TILLMANN, U.; TILMAN, A.; JOHN, U. CEMBELLA, A. (2008). Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. **Harmful Algae**. Vol. 7. p. 52 – 64.

UTKILEN, H.; GJOLME, N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 61. p. 797 – 800.

VASSILAKAKI, M.; PFLUGMACHER, S. (2008). Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. **Journal of Applied Phycology**. Vol. 20. p. 219 – 225.

WANG, Z.; XIAO, B.; SONG, L.; WANG, C.; ZHANG, J. (2012). Responses and toxin bioaccumulation in duckweed (*Lemna minor*) under microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their joint stress. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 229 – 230. p. 137 – 144.

WANG, Z.; XIAO, B.; SONG, L.; WU, X.; ZHANG, J.; WANG, C. (2011). Effects of microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their mixture on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds and seedlings. **Ecotoxicology**. Vol. 20. p. 803 – 814.

WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. (Eds.) (2003). **Freshwater Algae of North America – Ecology and Classification**. London. Academic Press. 918p.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P. M.; MIHALI, T. K.; MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxins and its analogs. **Marine Drugs**. Vol. 8. p. 2185 – 2211.

YIN, L.; HUANG, J.; LI, D.; LIU, Y. (2005). Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. **Environmental Toxicology**. Vol. 20. p. 308 – 313.

YIN, L.; HUANG, J.; LI, W.; LIU, Y. (2006). Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. **Toxicon**. Vol. 48. p. 204 – 210.

ZILLIGES, Y.; KEHR, J.; MEISSNER, S.; ISHIDA, K.; MIKKAT, S.; HAGEMANN, M.; KAPLAN, A.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. **Plos One**. Vol. 6. p. 1 – 11.

CAPÍTULO 1

Saxitoxinas potencializam os efeitos alelopáticos de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Danilo Camargo-Santos¹, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira,^{1,2} Carlos Tadeu Santos Dias², Renato José Reis Molica³

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

³ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Author Correspondence: mbitt@usp.br

1 Resumo

Muitos estudos sobre a função ecológica das cianotoxinas focam o potencial alelopático dessas substâncias, principalmente microcistina (MC). Porém, há poucos trabalhos sobre a alelopátia de saxitoxinas (SX) em organismos fitoplanctônicos. Nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos alelopáticos de extratos brutos de *Cylindrospermopsis raciborskii*, com e sem SX (SX+ e SX-), em concentrações normalmente encontradas na natureza (0,5, 1,0; 5,0 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de SX totais) sobre o crescimento das linhagens *Microcystis wesenbergii* BCCUSP11, *M. aeruginosa* BCCUSP232, *Scenedesmus acuminatus* UFSCar036 e *Monoraphidium convolutum* CMEA/UFF0201. Os experimentos, com 14 dias de duração, foram feitos sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo e luz (24 \pm 1°C, 14:10h claro:escuro e 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em câmaras climáticas, com cultivos em tréplica. Os extratos brutos SX+ e SX- foram adicionados no 4º dia, e seus efeitos foram avaliados através das variações nas densidades celulares dos cultivos. Também foram medidas as concentrações de neo-saxitoxina (neo-SX), SX e MC (essa somente para *M. aeruginosa* BCCUSP232) dos cultivos, no momento da adição do extrato bruto SX+ (e SX-, para *M. aeruginosa* BCCUSP232) e no fim de cada experimento, através de testes ELISA. Os extratos brutos SX+ e SX- inibiram a densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11, *M. aeruginosa* BCCUSP232 e *S. acuminatus* UFSCar036. Não houve efeito alelopático em *M. convolutum* CMEA/UFF0201. As concentrações finais de neo-SX e SX foram sempre menores que no início dos experimentos, em todos os tratamentos, havendo sempre mais SX do que neo-SX. Houve maior concentração de MC nos tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+. Nós concluímos que há substâncias presentes nos dois extratos brutos de *C. raciborskii* capazes de provocar efeitos alelopáticos. Os nossos resultados também sugerem que a SX potencializa esses efeitos e aumenta a produção de MC por *M. aeruginosa*.

2 Introdução

A utilização de corpos aquáticos por atividades antrópicas causa vários impactos ambientais, tais como a eutrofização e subseqüentes florações de cianobactérias, que dominam a estrutura da comunidade fitoplanctônica. Além de comprometer a qualidade da água, essas florações de cianobactérias podem ser danosas pela potencialidade da liberação de cianotoxinas (Chorus e Bartram, 1999).

Carmichael (1992) definiu cianotoxinas como metabólitos secundários produzidos por cianobactérias que desencadeiam efeitos nocivos em células, tecidos ou organismos. As toxinas mais estudadas são as microcistinas (MC), que provocam o desarranjo do citoesqueleto dos hepatócitos e hemorragia intra-hepática ao inibir as proteína-fosfatases 1 e 2A, (Mackintosh et al, 1990), podendo ainda promover tumores hepáticos (Falconer, 1991). Além disso, as MC são as mais relatadas à casos de envenenamento por exposição à toxina (Jochimsen et al, 1998; Saqrane e Oudra, 2009; Bownik, 2010; Ledreux et al, 2010; Mankiewicz-Boczek et al, 2011; Metcalf et al, 2012). Porém, as saxitoxinas (SX) são de grande importância, pois apresentam a maior toxicidade para mamíferos, com LD₅₀ média de 10µg.Kg⁻¹ (Araóz et al, 2010), agindo sobre os canais de sódio da membrana plasmática de axônios, inibindo assim a condução de impulsos elétricos (Wiese et al, 2010).

Porém, a função ecológica das cianotoxinas é ainda desconhecido (Sedmak e Kosi, 1998; Gross, 2003; Babica et al, 2006). Kearns e Hunter (2000) relataram que as MC podem ser responsáveis por inibir o crescimento de outros seres vivos fotoautotróficos aquáticos, ou seja, seriam compostos alelopáticos.

A alelopatia é um conjunto de interações bioquímicas, estimulantes ou inibitórias, entre bactérias, fungos, algas ou vegetais em um organismo-alvo (Rice, 1984). A maioria dos estudos sobre alelopatia de cianotoxinas em organismos fitoplanctônicos envolveu a utilização de MC em altas concentrações, como Sedmak e Kosi (1998), Hu et al (2005), Ou et al, (2005) e Babica et al (2007). Porém, poucos trabalhos sobre alelopatia com MC descreveram os seus efeitos em concentrações normalmente encontradas em um ambiente aquático sem floração de cianobactérias, (abaixo de 10µg.L⁻¹). Os resultados dos estudos citados anteriormente foram controversos entre si, ou seja, as respostas alelopáticas não

são similares, podendo haver inibição para determinadas espécies enquanto para outros organismos há estímulo na presença de MC (Babica et al, 2006, Leão et al, 2009a).

Existem poucos trabalhos que abordaram a alelopatia de organismos produtores de SX. Para ambientes marinhos, onde são freqüentes a ocorrência de dinoflagelados potencialmente produtores de SX, como *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* (Wiese et al, 2010), alguns estudos, como Tillmann e John (2002), Fistarol et al (2004) e Tillmann et al (2008), enfatizaram a ação alelopática do organismo produtor, porém sem utilizar diretamente a SX. Contudo, poucos estudos investigaram os efeitos diretos das SX em organismos fitoplanctônicos. Hattenrath-Lehmann e Gobler (2011) não registraram efeitos alelopáticos causados por SX em espécies de dinoflagelados e diatomáceas. Por outro lado, *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Deangeard sofreu estresse oxidativo na presença de $0,9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SX (Melegari et al, 2012). Ou seja, parece que igualmente ao que ocorre com MC, não há similaridade nas respostas alelopáticas de organismos fitoplanctônicos frente à SX.

Em ambientes dulcícolas, há algumas cianobactérias capazes de produzir SX, como *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet e Flahault, *Anabaena lemmermanni* P. Richter e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolöszinka) Seenayya et Subba Raju (Wiese et al, 2010). Figueiredo et al (2007) sugeriram que *C. raciborskii* produziria compostos alelopáticos para favorecer a sua dominância na comunidade fitoplanctônica, embora não esclarecessem quais seriam esses compostos e nem tampouco os relacionaram à produção de SX.

Em vista disso, nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos alelopáticos de extratos brutos de *C. raciborskii*, com e sem SX, sobre o crescimento das microalgas verdes *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat e *Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová e das cianobactérias *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing em diferentes concentrações, próximas às encontradas no ambiente dulciaquícola. Nossa hipótese é que as SX não provocam efeitos alelopáticos em concentrações normalmente encontradas no ambiente.

3 Material e Métodos

3.1 Linhagens utilizadas e condições de cultivo

As linhagens-alvo utilizadas foram *Microcystis wesenbergii* BCCUSP11 (não produtora de MC, segundo Bittencourt-Oliveira et al, 2011), *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 (produtora de MC, segundo Bittencourt-Oliveira, 2003), *Scenedesmus acuminatus* UFSCar036 e *Monoraphidium convolutum* CMEA/UFF0201 (Tabela 1). Todas as linhagens foram mantidas em meio líquido ASM-1, pH 7,4 (Guillard, 1973), em câmaras climáticas com intensidade luminosa ($40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, medida com fotômetro LI-COR, modelo LI-250, com sensor esférico subaquático), fotoperíodo (14:10h, claro:escuro) e temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados.

3.2 Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias

Os extratos utilizados foram obtidos a partir das linhagens *C. raciborskii* ITEPA1, produtora de SX (SX+) e *C. raciborskii* ITEP31, não produtora de ST (SX-), ambas do Instituto Tecnológico de Pernambuco, cultivando aproximadamente 20 litros de cada uma das linhagens nas condições supracitadas. Os cultivos foram centrifugados durante a fase exponencial de crescimento a 10.000 rpm, por 15 minutos à temperatura de 20°C . A biomassa resultante foi liofilizada e estocada em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

3.3 Determinação da concentração de saxitoxinas nos extratos brutos

As concentrações de SX totais por peso de massa seca do extrato bruto SX+ foram obtidas segundo Oshima (1995). Resumidamente, a partir do material liofilizado, realizou-se extração com ácido acético 0,05N. O extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) através de um sistema on-line de derivatização pós-coluna e monitoramento em detector de fluorescência (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As saxitoxinas foram identificadas e quantificadas por comparação com o tempo de

retenção e com as áreas dos picos dos padrões. Os padrões utilizados para a análise e as concentrações obtidas estão demonstrados na Tabela 2, e foram adquiridos do National Research Council Canadá – Certified Reference Materials Program.

3.4 Preparação do extrato bruto aquoso e adição de SX nos cultivos

O extrato bruto aquoso foi preparado a partir de 76mg de massa liofilizada de *C. raciborskii* ITEPA1 adicionados a 8mL de água deionizada autoclavada e ultrassonicado por cinco minutos a 15W e 22,5kHz (Microsom Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) para o rompimento das células. Dessa forma, foi obtida uma solução inicial contendo todos os compostos químicos presentes nas células, inclusive as SX totais, cuja concentração era igual a $6000\mu\text{g.L}^{-1}$. Então, essa solução inicial foi inserida (com as devidas diluições) nos cultivos para que as concentrações resultantes de SX totais nos cultivos fossem de $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$, $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para os tratamentos $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$, $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$ SX-, o extrato bruto aquoso sem SX (a partir de *C. raciborskii* ITEP31) foi preparado seguindo o mesmo procedimento.

3.5 Desenho experimental

Quatro experimentos de 14 dias foram realizados expondo quatro linhagens de cianobactérias e microalgas (Tabela 1) aos extratos brutos aquosos com e sem SX totais, os quais foram adicionados no 4º dia de cultivo (inicial). Os cultivos foram realizados em câmaras climáticas idênticas com intensidade luminosa ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (14:10h, claro:escuro) e temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados. Para cada experimento foram utilizados erlenmeyers com 1.000mL de capacidade contendo 600mL de cultivo ASM-1 pH 7.4, os quais foram agitados manualmente e suas posições nas câmaras alteradas diariamente. Foram feitas tréplicas para todos os tratamentos e controle ($n = 3$), com densidade celular inicial de $1,0 \times 10^5$ células

por mililitro (cel.mL^{-1}). As concentrações de SX totais, neo-SX e SX aplicadas nos cultivos constam na Tabela 1.

3.6 Cálculo da densidade celular

Para todos os tratamentos e controle, alíquotas de 2mL foram retiradas dos cultivos e imediatamente preservadas com lugol 10%, em fluxo laminar, a cada dois dias, a partir de 48 horas após o inóculo inicial. A estimativa da densidade celular dos cultivos foi realizada com contagens em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico, segundo Guillard (1973). Para maior confiabilidade dos resultados, o mínimo de 400 células foi quantificado para uma estimativa de erro em torno de 10% (Lund et al, 1958). Independente do número de células estimado, três câmaras foram contadas. A densidade celular foi expressa em cél.mL^{-1} .

3.7 Determinação da concentração de cianotoxinas dos cultivos

Imediatamente após a adição do extrato bruto aquoso SX+ (no 4º dia de experimento) nos cultivos (Tabela 1), foram retiradas alíquotas de 1mL para a análise da concentração aplicada de neo-SX e SX. No 14º dia foram retiradas alíquotas de 1 mL para obter as concentrações de neo-SX e SX no final do experimento. Para a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232 (produtora de MC), foi realizado o mesmo procedimento, para se obter as concentrações iniciais de MC no dia da aplicação dos extratos SX+ e SX- (4º dia), bem como as finais (14º dia) (Tabela 3). As amostras foram mantidas em freezer -80°C , e no momento da análise foram descongeladas e ultrassonicadas por 3 minutos (15W e 22,5kHz) para a lise celular.

A determinação das concentrações de neo-SX, SX e MC totais foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), com os respectivos kits em placa Beacon (Beacon Analytical Systems Inc., Portland, ME, USA), todos segundo recomendações do fabricante. As faixas de detecção e especificidades de cada kit são apresentadas na Tabela 4. Foram utilizados os controles positivos e

negativos dos próprios kits, quando necessário. As análises foram feitas em triplicatas. Os resultados foram expressos em microgramas por litro ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

3.8 Análise estatística

Os dados de densidade celular e concentração de neo-SX, SX e MC totais obtidos nos experimentos foram submetidos a um teste de normalidade e homocedasticidade, com posterior análise de variância “one-way” (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0,05$). Para a densidade celular, foram averiguadas as diferenças significativas entre os diferentes tratamentos a cada dia, isoladamente, dentro de cada experimento. Já para as concentrações de neo-SX, SX e MC, foram verificadas as diferenças significativas entre o dia da aplicação do extrato (4^o de experimento) e o dia final dos experimentos (14^o dia).

4 Resultados

Os extratos brutos SX+ e SX- provocaram efeitos diferenciados nas linhagens-alvo testadas, ora inibindo, ora não influenciando na densidade populacional. Quando ocorreram efeitos inibitórios, estes sempre tornaram-se evidentes no mínimo quatro dias após a adição dos extratos SX+ e SX-. Ou seja, a resposta frente às substâncias aleloquímicas não foi imediata. Os extratos SX+ e SX- provocaram efeito alelopático inibitório nas linhagens *M. wesenbergii* BCCUSP11 (Figura 1), *M. aeruginosa* BCCUSP232 (Figura 2) e *S. acuminatus* UFSCar036 (Figura 3). Por outro lado, a densidade celular da linhagem *M. convolutum* CMEA/UFF0201 não foi afetada pelos extratos SX+ e SX- (Figura 4).

M. wesenbergii BCCUSP11 sofreu inibição significativa no 10º ao 14º dia em relação ao controle para os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+. Após o 10º dia, houve maior inibição de 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação a 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$. Contudo, o extrato SX-, no tratamento 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$, também foi capaz de inibir o aumento da densidade celular dessa cianobactéria no 14º dia de experimento. Já para outra espécie de cianobactéria, *M. aeruginosa* BCCUSP232, a densidade celular foi significativamente menor no tratamento 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ no 12º e 14º dia. Também houve diferença significativa entre 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX- e o controle apenas no 12º dia.

Com a microalga verde *S. acuminatus* UFSCar036, os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ mostraram densidades celulares significativamente menores ($p < 0,05$) que os demais e o controle no 12º e 14º dia. Já os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX- apresentaram densidades celulares menores ($p < 0,05$) em relação ao controle apenas no 14º dia.

No final do experimento (14º dia) houve redução na concentração de neo-SX e SX em todos os experimentos (Figura 5). A concentração de neo-SX nos quatro experimentos, em todos os tratamentos, sofreu um decaimento mínimo de 52% (Tabela 1), ficando sempre abaixo de $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo sempre significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao dia da aplicação do extrato SX+. Por outro lado, as concentrações de SX nos quatro experimentos e para todos os tratamentos, sofreram decaimentos menores, sempre abaixo de 50% (Tabela 1), exceto para 5,0

SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ com *M. convolutum* CMEA/UFF0201 (com 90% de decaimento). Comparando as concentrações de SX aplicadas com as concentrações de SX obtidas ao final, para *M. wesenbergii* BCCUSP11 e *S. acuminatus* UFSCar036, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas para os tratamentos 0,5 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+. Para a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232, houve diferença significativa para os tratamentos 0,5 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+, enquanto para *M. convolutum* CMEA/UFF0201 as diferenças significativas apareceram em 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX-. É importante salientar que concentrações finais de SX foram sempre maiores que as finais de neo-SX dentro de cada experimento, em todos os tratamentos.

As concentrações de MC (provenientes de *M. aeruginosa* BCCUSP232) no final do experimento foram significativamente maiores do que no dia da aplicação dos extratos SX+ e SX-, para todos os tratamentos (Figura 6). Os cultivos que receberam os tratamentos 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ do extrato SX+ apresentaram as maiores concentrações finais de MC (86,23 e 114,005 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente). A maior porcentagem de aumento da concentração de MC (967%) foi registrada para o tratamento 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ (Tabela 3).

5 Discussão

Mesmo com redução das concentrações de neo-SX e SX durante os experimentos, o extrato SX+ foi capaz de provocar efeitos alelopáticos na densidade celular das linhagens *M. wesenbergii* BCCUSP11, *M. aeruginosa* BCCUSP232 e *S. acuminatus* UFSCar036. Os experimentos com a cianobactéria *M. wesenbergii* BCCUSP11 e a microalga verde *S. acuminatus* UFSCar036 apresentaram resultados semelhantes entre si, mostrando que outras substâncias presentes nos extratos SX+ e SX-, além das toxinas, são capazes de afetar a densidade celular dos cultivos após um determinado período de exposição.

Fistarol et al (2004) e Hattenrath-Lehmann e Gobler (2011) utilizando organismos de ambientes marinhos potencialmente produtores de SX, mostraram que outras substâncias, que não a SX, estavam envolvidas em relações alelopáticas na comunidade fitoplanctônica. Nesses estudos, foram utilizados filtrados de linhagens pertencentes a diferentes espécies do gênero *Alexandrium* (dinoflagelado), produtoras e não produtoras de SX, sobre comunidades fitoplanctônicas, compostas principalmente por dinoflagelados e diatomáceas, cultivadas em laboratório. Todas as linhagens de *Alexandrium* foram capazes de inibir o crescimento dos organismos fitoplanctônicos. Nossos resultados com cianobactérias de ambiente dulciquícola corroboram os achados, pois *C. raciborskii* também possuem compostos, sem ser a SX, que provocaram efeitos alelopáticos.

Utilizando filtrados de linhagens não tóxicas de *C. raciborskii*, Suikkanen et al (2004) e Mello et al (2012) observaram a inibição no crescimento de *Rhodomonas* sp. e *M. aeruginosa*, respectivamente. Figueiredo et al (2007), também utilizando filtrados de linhagens não tóxicas de *C. raciborskii*, registraram inibição da fotossíntese de *M. wesenbergii* e *M. aeruginosa*. Nesses estudos não foram identificados qual(is) composto(s) estariam envolvidas no processo alelopático.

Os resultados observados com o uso do extrato bruto SX- também mostraram efeitos alelopáticos na densidade celular de *M. wesenbergii*, *M. aeruginosa* e *S. acuminatus*. Contudo, fica evidente que as SX potencializam o efeito alelopático produzidos por *C. raciborskii*.

Os tratamentos SX+ com as maiores concentrações (5,0 e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$) foram mais eficazes em reduzir a densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11 do que os não tóxicos correspondentes. A maior inibição em 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ sobre essa cianobactéria sugere ainda que há uma resposta alelopática SX-concentração-dependente na densidade celular dessa linhagem. A concentração final de MC foi maior para os tratamentos SX+ do que para os SX-, principalmente em 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$, evidenciando a ação das toxinas no estímulo à produção de MC.

Reduções nas divisões celulares (Hattenrath-Lehmann e Gobler, 2011) e modificações no funcionamento de enzimas antioxidativas (Melegari et al, 2012) são alguns efeitos já relatados da ação da SX em organismos fitoplanctônicos que estão relacionados ao metabolismo celular. Na cianobactéria *M. aeruginosa* BCCUSP232 (produtora de MC), a presença da SX exógena provocou o aumento da produção de MC, o que talvez possa ser uma estratégia competitiva frente a outra cianobactéria tóxica.

Portanto, em um ambiente aquático com predominância de cianobactérias, a morte em massa de indivíduos de *C. raciborskii* produtores de SX, além de aumentar a concentração dessa toxina no meio, pode levar a um aumento de produção de MC por indivíduos de *M. aeruginosa*. Em outras palavras, após um evento de floração de *C. raciborskii* produtora de SX, caso ocorra o estabelecimento da dominância de *M. aeruginosa* na comunidade fitoplanctônica, uma floração dessa cianobactéria pode ser mais tóxica, devido aos estímulos de produção de MC provocados pela SX.

Diferentemente das outras espécies, *Monoraphidium convolutum* CMEA/UFF0201 não sofreu influência dos extratos SX+ e SX- em sua densidade celular, ou seja, os compostos presentes nos dois extratos não foram capazes de provocar efeito alelopático nessa microalga verde. Resultados semelhantes foram obtidos por Suikkanen et al (2004), utilizando filtrados (sem SX) de duas cianobactérias potencialmente produtoras de SX (*Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet e Flahault e *Anabaena lemmermanni* P. Richter) sobre *Prymnesium parvum* N. Carter (dinoflagelado). Igualmente, Leão et al (2009b) utilizando filtrados de *C. raciborskii* não tóxica em duas microalgas verdes (*Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs e *Chlorella vulgaris* Beyerinck) observaram o mesmo efeito. Em ambos

os estudos não foi registrado qualquer efeito no crescimento das linhagens-alvo. Ou seja, essas espécies, incluindo *M. convolutum*, parecem ser indiferentes à presença das substâncias produzidas por cianobactérias potenciais produtoras de SX.

O extrato da linhagem *C. raciborskii* ITEPA1 (SX+) e todas as amostras retiradas no 4º dia de todos os experimentos continham maior concentração de neo-SX do que SX. Molica et al (2002) já registraram maior produção de neo-SX do que SX por outra linhagem de *C. raciborskii* do Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP18). Porém, houve redução da concentração das duas substâncias nos cultivos de todos os tratamentos. Como os cultivos não são axênicos, bactérias presentes nas culturas podem ter degradado parte das SXs, contribuindo para a redução de suas concentrações (Ho et al, 2012a).

Donovan et al (2008) e Ho et al (2012b) encontraram biodegradação de SX por bactérias em seus estudos, embora esses autores salientem que esse processo seja muito lento. Essa premissa é reforçada por nosso estudo, pois no fim dos experimentos há maior concentração de SX em relação à neo-SX. Além disso, segundo Wiese et al (2010), a neo-SX pode sofrer uma transformação química para SX ao perder um átomo de oxigênio. Ou seja, a degradação química de neo-SX contribui para a manutenção de maior concentração de SX. Por fim, a SX sofre menor degradação, uma vez que sua meia-vida é de, no mínimo, uma semana (Chorus e Bartram, 1999; Ho et al, 2012a). Por conta disso, os valores de decaimento da concentração de neo-SX são maiores que os valores de SX. Isso sugere que, embora inicialmente a neo-SX esteja em maior concentração, é a SX que de fato pode atuar como composto alelopático ou potencializando o efeito alelopático de outras substâncias produzidas por *C. raciborskii*. É importante salientar que não foi possível explicar a queda anormal da concentração de SX no tratamento 5,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato SX+ com a linhagem *M. convolutum* CMEA/UFF0201.

Como nós utilizamos extratos de *C. raciborskii* nos experimentos, foram liberadas nos cultivos todas as substâncias produzidas por essa cianobactéria. Por isso, os efeitos alelopáticos podem ter sido causados por um ou mais compostos, ou até mesmo pela interação entre eles (como ocorreu com a SX). Porém, não foi realizado o isolamento e a identificação desses compostos. Além disso, outros tipos

de efeitos alelopáticos podem ter ocorrido, como inibição de fotossíntese ou estresse oxidativo, que não foram detectados por não serem alvo desse trabalho. Assim, mais estudos são necessários para que essas substâncias sejam identificadas.

Em conclusão, nossos experimentos mostraram que há compostos nos dois extratos brutos de *C. raciborskii* que podem provocar efeitos alelopáticos em organismos fitoplânctônicos. Além disso, na presença das SXs, esses efeitos alelopáticos são potencializados. Por fim, as SX parecem provocar mudanças metabólicas na cianobactéria *M. aeruginosa*, estimulando a produção de MC.

6 Rerefências Bibliográficas

ARAÓZ, R.; MOLGÓ, J.; MARSAC, N. T. (2010). Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**. Vol. 56. 813 – 828.

BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, Vol. 42. p. 9 – 20.

BABICA, P.; HILSCHEROVA, K.; BARTOVA, K.; BLAHA, L.; MARSALEK, B. (2007). Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. **Phycologia**. Vol. 46. p. 137 – 142.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. (2003). Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**. Vol. 2. p. 51 – 60.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; PINTO, E. (2011). Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Biology**. Vol. 71. p. 209 – 216.

BOWNIK, A. (2010). Harmful algae: effects of alkaloid cyanotoxins on animal and human health. **Toxin Reviews**. Vol. 29. p. 99 – 114.

CARMICHAEL, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**. Vol. 72. p. 445 – 459.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) (1999). **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London. E&FN Spon. 416p.

DONOVAN, C. J.; KU, J. C.; QUILLIAM, M. A.; GILL, T. A. (2012). Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins. **Toxicon**. Vol. 52. p. 91 – 100.

FALCONER, I. R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of Cyanobacteria. **Environmental Toxicology and Water Quality**. Vol. 6. p. 177 - 184.

FIGUEIREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**. Vol. 43. p. 256 – 265.

FISTAROL, G. O.; LEGRAND, C.; SELANDER, E.; HUMMERT, C.; STOLTE, W.; GRANALI, E. (2004). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. **Aquatic Microbial Ecology**. Vol. 35. p. 45 – 56.

GROSS, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Vol. 22. p. 313 – 339.

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

HATTENRATH-LEHMANN, T. K.; GOBLER, C.J. (2011). Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: Evidence from field experiments, laboratory experiments, and bloom events. **Harmful algae**. Vol. 11. p. 106 – 116.

HO, L.; TANG, T.; MORRIS, P. T.; HOEFEL, D. (2012a). Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. **Chemosphere**. Vol. 87. p. 1149 – 1154.

HO, L.; TANG, T.; HOEFEL, D.; VIGNESWARAN, B. (2012b). Determination of rate constants and half-lives for the simultaneous biodegradation of several cyanobacterial metabolites in Australian source waters. **Water Research**. Vol. 46. p. 5735 – 5746.

HU, Z. Q.; LIU, Y. D.; LI, D. H.; DAUTA, A. (2005). Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. **Hydrobiologia**. Vol. 534. p. 23 – 29.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO-FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.; Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 338. p. 873 – 878.

KEARNS, K. D.; HUNTER, M. D. (2000). Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. **Environmental Microbiology**. Vol. 2. p. 291 – 297.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. (2009a). Allelopathy in freshwater cyanobacteria. **Critical Reviews in Microbiology**. Vol. 35. p. 271 – 282.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. (2009b). Allelopathic activity of cyanobacteria on green algae at low densities. **European Journal of Phycology**. Vol. 44. p. 347 – 355.

LEDREUX, A.; THOMAZEAU, S.; CATHERINE, A.; DUVAL, C.; YÉPRÉMIAN, C.; MARIE, A.; BERNARD, C. (2010). Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. **Harmful Algae**. Vol. 10. p. 88 – 97.

LUND, J. W. G., KIPLING, C. & LE CREN, E. D. (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**. Vol. 11. p. 143 -170.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letter**. Vol. 264. p. 187 - 192.

MANKIEWICZ-BOCZEC, J.; PALUS, J.; GAGALA, I.; IZYDORCZYK, K.; JURCZAK, T.; DZIUBALTOWSKA, E.; STEPNIK, M.; ARKUSZ, J.; KOMOROWSKA, M.; SKOWRON, A.; ZALEWSKI, M. (2011). Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. **Harmful Algae**. Vol. 10. p. 356 – 365.

MELEGARI, S. P.; PERREAULT, F.; MOUKHA, S.; POPOVIC, R.; CREPPY, E. E.; MATIAS, W. G. (2012). Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. **Chemosphere**. Vol. 89. p. 38 – 43.

MELLO, M. M.; SOARES, M. C. S.; ROLAND, F.; LÜRLING, M. (2012). Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of Plankton Research**. Vol. 34. p. 987 – 994.

METCALF, J. S.; RICHER, R.; COX, P. A.; CODD, G. A. (2012). Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. **Science of the Total Environment**. Vol. 421. p. 118 – 123.

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. (2002). Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**. Vol. 41. p. 606 - 611.

OSHIMA, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**. Vol. 78. 528 – 532.

OU, D. Y.; SONG, L. R.; GAN, N. Q.; CHEN, W. (2005). Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poteroiochromonas* sp. **Environmental Toxicology**. Vol. 20. p. 373 – 380.

RICE, E. I. (1984). **Allelopathy**. Academic Press. Orlando.

SAQRANE, S.; OUDRA, B. (2009). *CyanoHAB* occurrence and water irrigation cyanotoxin contamination: ecological impacts and potential health risks. **Toxins**. Vol. 1. p. 113 – 122.

SEDMAK, B.; KOSI, G. (1998). The role of microcystin in heavy cyanobacterial bloom formation. **Journal of Plankton Research**. Vol. 20. p. 691 – 708.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. (2004). Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *aphanizomen flos-aquae* and *Anabaena lemmermanni* on algal monocultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Vol. 308. p. 85 – 101.

TILLMANN, U.; JOHN, U. (2002). Toxic effects of *Alexandrium* spp. On heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defende mechanism independent of PSP-toxin content. **Marine Ecology Progress Series**. Vol. 230. p. 47 – 58.

TILLMANN, U.; TILMAN, A.; JOHN, U. CEMBELLA, A. (2008). Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heretotrophic protists. **Harmful Algae**. Vol. 7. p. 52 – 64.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P. M.; MIHALI, T. K.; MOFFITT, M. C.; NEILAN. B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxins and its analogs. **Marine Drugs**. Vol. 8. p. 2185 – 2211.

7 Anexos

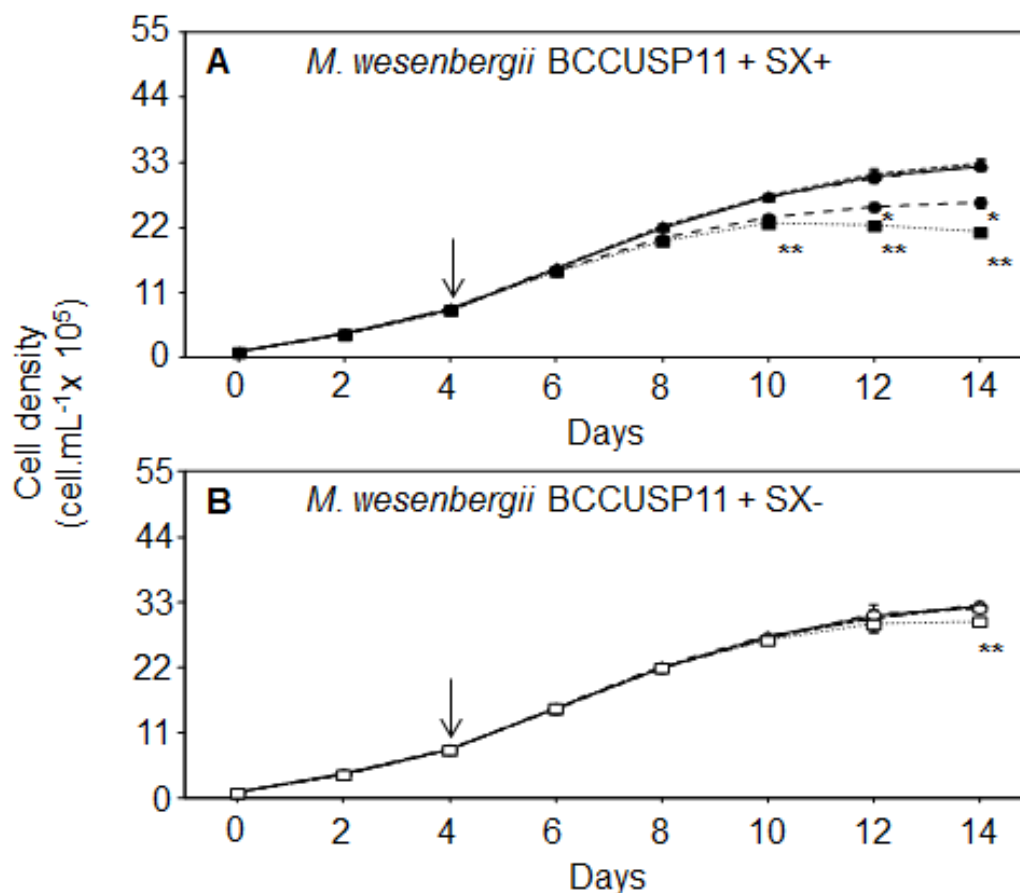


Figura 1. Densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ µg.L⁻¹ (-◆-), 0,5 SX- µg.L⁻¹ (-◇-), 1,0 SX+ µg.L⁻¹ (-▲-), 1,0 SX- µg.L⁻¹ (-△-), 5,0 SX+ µg.L⁻¹ (-●-), 5,0 SX- µg.L⁻¹ (-○-), 10,0 SX+ µg.L⁻¹ (-■-), 10,0 SX- µg.L⁻¹ (-□-). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 SX µg.L⁻¹ e controle (*) e 10,0 SX µg.L⁻¹ e controle (**). O extrato SX+ provocou efeito alelopático na densidade celular após o 6º dia, enquanto que o SX- inibiu a densidade celular a 10,0µg.L⁻¹ somente no 14º dia.

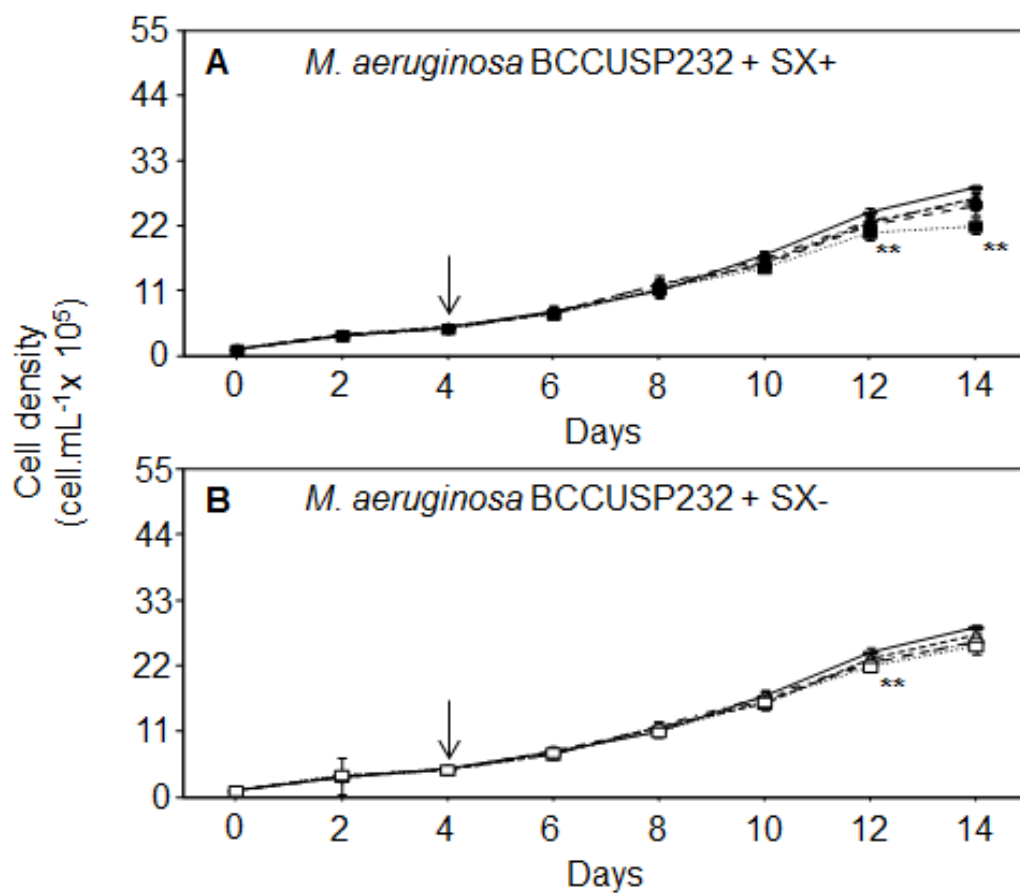


Figura 2. Densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆-), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇-), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-▲-), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-△-), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-■-), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-□-). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 10,0 SX $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). O extrato SX+ provocou efeito alelopático para 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no 12º e 14º dia. O extrato SX- inibiu a densidade celular do tratamento 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ somente no 12º dia.

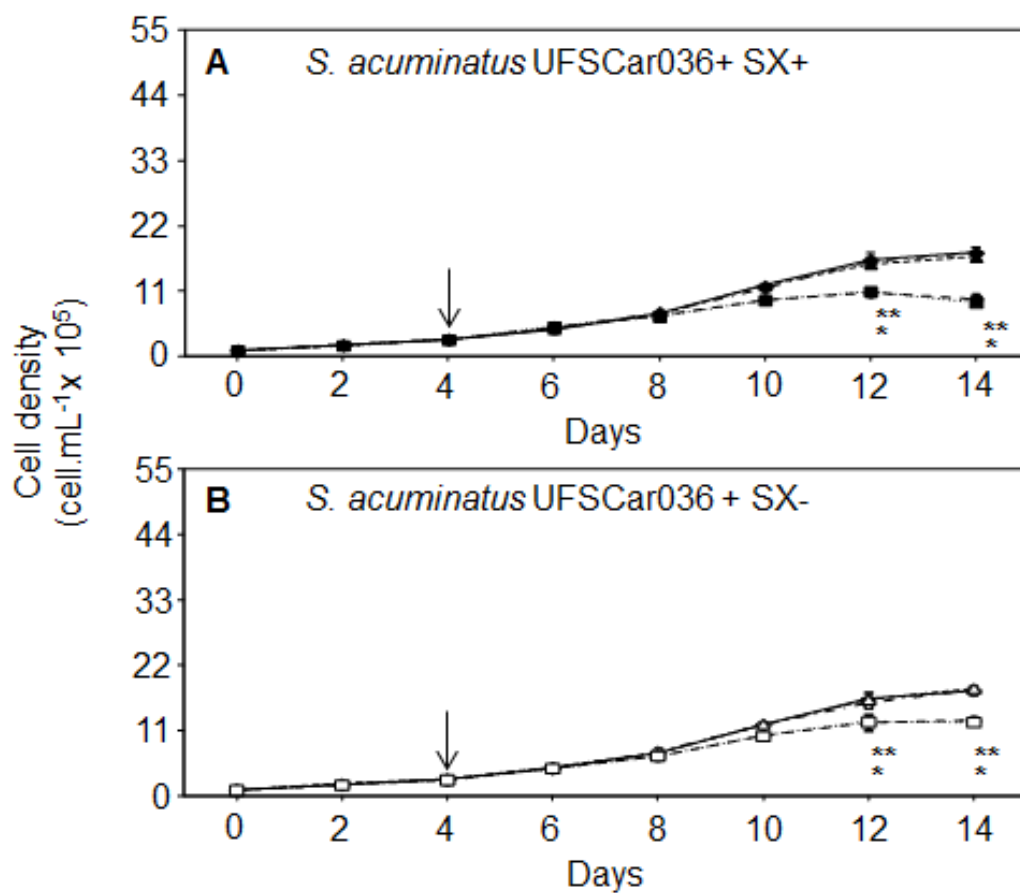


Figura 3. Densidade celular de *S. acuminatus* UFSCar036. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ µg.L⁻¹ (-◆-), 0,5 SX- µg.L⁻¹ (-◇-), 1,0 SX+ µg.L⁻¹ (-▲-), 1,0 SX- µg.L⁻¹ (-△-), 5,0 SX+ µg.L⁻¹ (-●-), 5,0 SX- µg.L⁻¹ (-○-), 10,0 SX+ µg.L⁻¹ (-■-), 10,0 SX- µg.L⁻¹ (-□-). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 SX µg.L⁻¹ e controle (*) e 10,0 SX µg.L⁻¹ e controle (**). Os extratos SX+ e SX- provocaram igualmente efeitos alelopáticos nas densidades celulares no 12º e 14º dia.

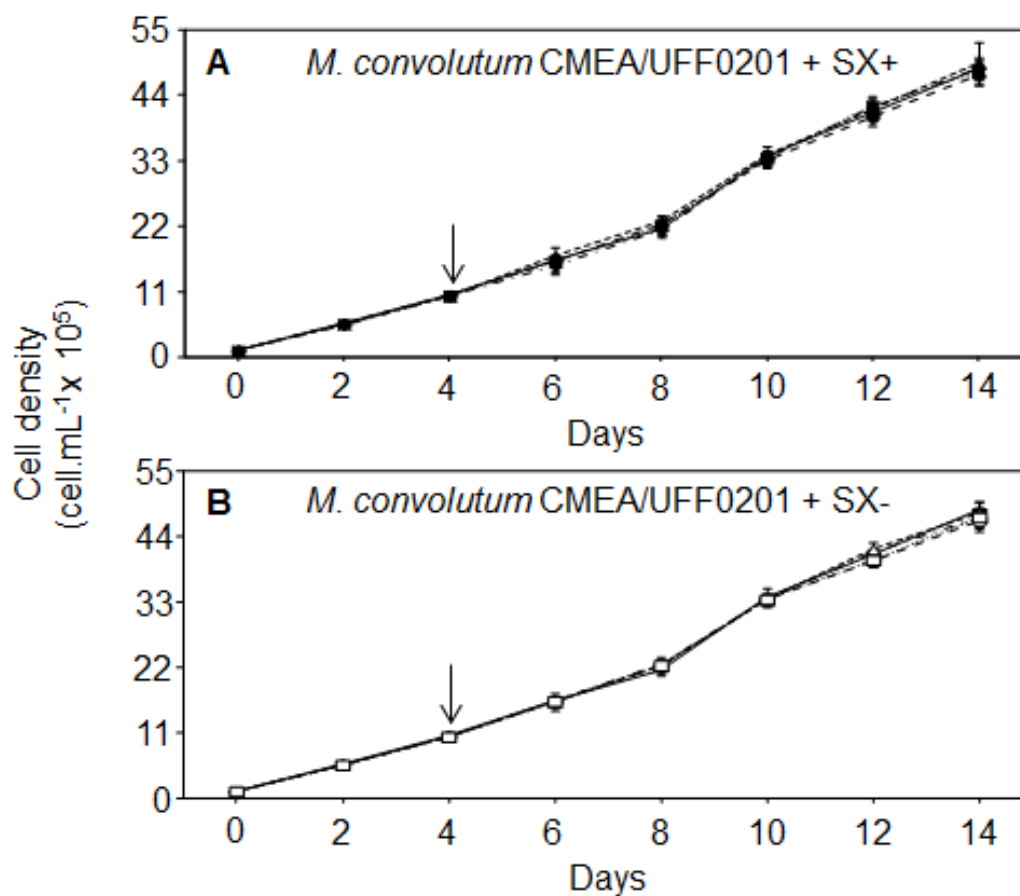


Figura 4. Densidade celular de *M. convolutum* CMEA/UFF0201. A: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEPA1 SX+. B: Tratamentos com o extrato *C. raciborskii* ITEP31 SX-. Controle (—), 0,5 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆-), 0,5 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇-), 1,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-▲-), 1,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-△-), 5,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 SX+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-■-), 10,0 SX- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-□-). Adição dos extratos (Seta). Os extratos SX+ e SX- não provocaram efeitos alelopáticos nas densidades celulares.

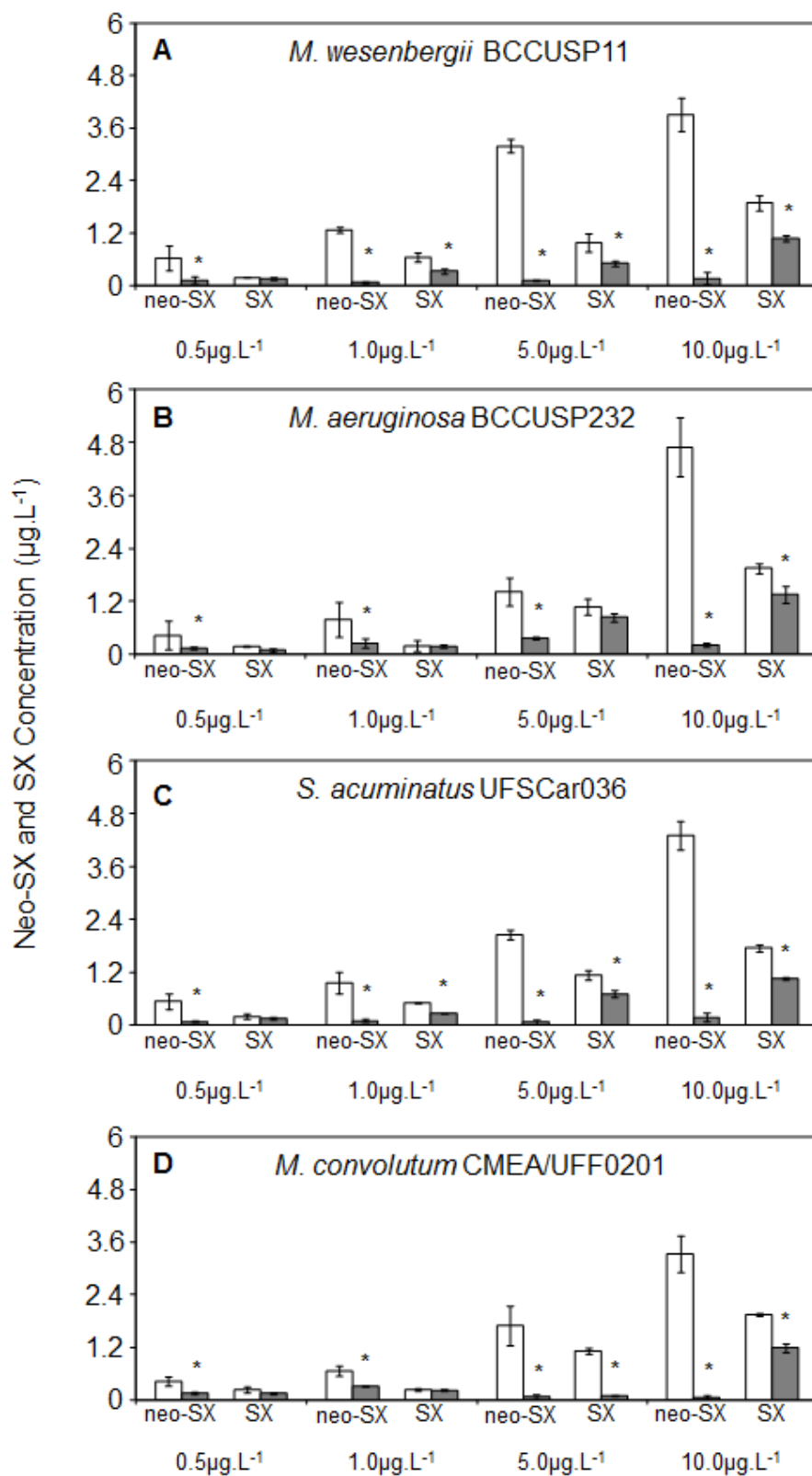


Figura 5. Concentrações iniciais e finais de neo-SX e SX nos experimentos. A: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11. B: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. C: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *S. acuminatus* UFSCar036. D: Concentração de neo-SX e SX nos tratamentos com o extrato SX+ no experimento com a linhagem *M. convolutum* CMEA/UFF0201. Diferença significativa de concentração de neo-SX e SX entre o dia da aplicação do extrato (4º dia) e o fim do experimento (*). De modo geral, a concentração inicial de neo-SX foi sempre maior que SX. No fim de todos os experimentos, houve sempre redução dos dois análogos, sendo a concentração de SX sempre maior que neo-SX.

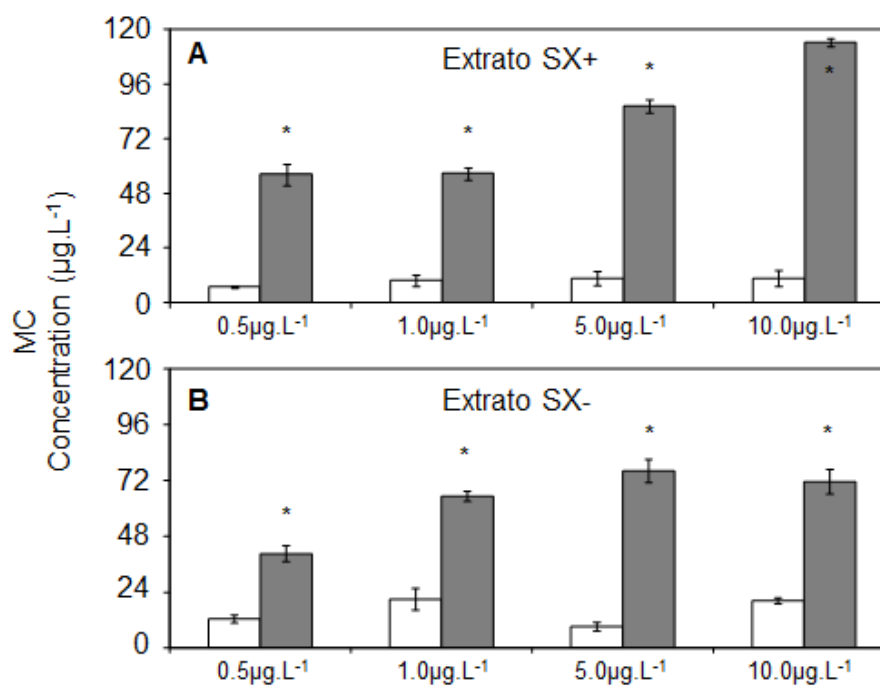


Figura 6. Concentrações iniciais e finais de MC no experimento com *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato SX+. B: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato SX-. Diferença significativa de concentração de MC entre o dia da aplicação dos extratos (4^o dia) e o fim do experimento (*). O extrato SX+ estimulou mais a produção de MC em relação ao extrato SX-, principalmente nos tratamentos 5,0 SX µg.L⁻¹ e 10,0 SX µg.L⁻¹.

Tabela 1. Tratamentos realizados com as linhagens-alvo (*Microcystis wesenbergii* BCCUSP11, *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232, *Scenedesmus acuminatus* UFSCar036 e *Monoraphidium convolutum* CMEA/UJFF0201) e extratos brutos de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEPA1 (SX+) e ITEP31 (SX-). Concentrações de SX totais dos extratos brutos (SX+) e (SX-) obtidas por HPLC ($\mu\text{g.L}^{-1}$), concentrações iniciais (4º dia) e finais (14º dia) de neo-SX e SX obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Decréscimo (%) da concentração inicial de neo-SX e SX. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. ITEP: Instituto Tecnológico de Pernambuco. UFSCar: Universidade Federal de São Carlos. CMEA/UJFF: Coleção Maria Elisabeth Aidar da Universidade Federal Fluminense. Não se aplica (NA).

Linhagem alvo	Extrato bruto	Concentrações		Concentrações Iniciais		Concentrações Finais		Decréscimo (%)	
		SX Totais	neo-SX	neo-SX	SX	neo-SX	SX	neo-SX	SX
<i>M. wesenbergii</i> BCCUSP11	<i>C. raciborskii</i> ITEPA1 (SX+)	0,5	0,618 ± 0,282	0,185 ± 0,002	0,125 ± 0,073	0,156 ± 0,035	79%	15%	
		1,0	1,269 ± 0,069	0,646 ± 0,113	0,076 ± 0,002	0,327 ± 0,059	93%	49%	
		5,0	3,192 ± 0,164	0,980 ± 0,208	0,113 ± 0,011	0,503 ± 0,059	96%	48%	
		10,0	3,900 ± 0,383	1,886 ± 0,177	0,161 ± 0,134	1,067 ± 0,069	95%	43%	
<i>C. raciborskii</i> ITEP31 (SX-)	NA	0,5							
		1,0							
		5,0							
		10,0							

Tabela 1. Continuação.

Linhagem alvo	Extrato bruto	Concentrações		Concentrações Iniciais		Concentrações Finais		Decréscimo (%)	
		SX Totais	neo-SX	neo-SX	SX	neo-SX	SX	neo-SX	SX
<i>M. aeruginosa</i>	<i>C. raciborskii</i> ITEPA1 (SX+)	0,5	0,425 ± 0,324	0,173 ± 0,010	0,132 ± 0,028	0,090 ± 0,031	68%	47%	
		1,0	0,780 ± 0,393	0,189 ± 0,126	0,244 ± 0,105	0,181 ± 0,039	68%	4%	
		5,0	1,426 ± 0,316	1,077 ± 0,179	0,358 ± 0,026	0,836 ± 0,096	74%	22%	
		10,0	4,690 ± 0,669	1,950 ± 0,115	0,216 ± 0,042	1,357 ± 0,190	95%	30%	
BCCUSP232	<i>C. raciborskii</i> ITEP31 (SX-)	0,5							
		1,0							
		5,0							
		10,0							
<i>S. acuminatus</i>	<i>C. raciborskii</i> ITEPA1 (SX+)	0,5	0,543 ± 0,172	0,153 ± 0,016	0,088 ± 0,014	0,149 ± 0,010	83%	2%	
		1,0	0,964 ± 0,242	0,507 ± 0,016	0,109 ± 0,036	0,267 ± 0,007	88%	47%	
		5,0	2,049 ± 0,108	1,126 ± 0,106	0,075 ± 0,058	0,710 ± 0,075	99%	36%	
		10,0	4,293 ± 0,328	1,740 ± 0,082	0,185 ± 0,098	1,073 ± 0,013	95%	38%	
UFSCar036	<i>C. raciborskii</i> ITEP31 (SX-)	0,5							
		1,0							
		5,0							
		10,0							

Tabela 2: Padrões utilizados para análise do extrato bruto de *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEPA1 (SX+) através da técnica de HPLC, concentrações obtidas ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e a contribuição de cada análogo na concentração total obtida (%). Ausência da variante (-). Não se aplica (NA).

Padrões	Concentração obtida	%
Saxitoxina (SX)	0,0324	5,0
Neo-Saxitoxina (neo-SX)	0,2138	32,5
Gonyautoxina-1 (GTX-1)	-	NA
Gonyautoxina 2-3 (GTX2-3)	-	NA
dc-Saxitoxina (dc-SX)	0,4116	62,5
dc-Gonyautoxina 2-3 (dc-GTX2-3)	-	NA
Saxitoxinas totais	0,6578	100

Tabela 3. Tratamentos realizados com a linhagens-alvo *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232, concentrações de SX totais dos extratos brutos (SX+) e (SX-) obtidas por HPLC e concentrações iniciais (4º dia) e finais (14º dia) de MC obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Acréscimo (%) da concentração inicial de MC. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. ITEP: Instituto Tecnológico de Pernambuco.

Linhagem alvo	Extrato bruto	Concentrações SX Totais		Concentrações Iniciais de MC totais		Concentrações Finais de MC totais		Acréscimo (%)
<i>M. aeruginosa</i> BCCUSP232	<i>C. raciborskii</i> ITEPA1 (SX+)	0,5		7,028 \pm 0,564		56,235 \pm 1,229		700%
		1,0		9,717 \pm 1,357		56,562 \pm 2,391		482%
	5,0		10,649 \pm 1,893		86,230 \pm 1,945		709%	
	10,0		10,677 \pm 1,914		114,005 \pm 0,307		967%	
<i>C. raciborskii</i> ITEP31 (SX-)		0,5		12,485 \pm 1,578		40,53 \pm 3,069		224%
		1,0		21,029 \pm 1,312		65,21 \pm 2,842		210%
	5,0		9,246 \pm 1,974		76,07 \pm 2,111		722%	
	10,0		20,287 \pm 1,006		71,47 \pm 1,545		252%	

Tabela 4. Valores de afinidade (%) entre os análogos de SX e MC e os substratos dos kits Beacon (Beacon Analytical Systems Inc.) utilizados para as análises ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Informações obtidas diretamente do fabricante. Ausência (-). Faixas de detecção de neo-SX, SX MC, em partes por bilhão (ppb): 0,15 – 1,00, 0,02 – 0,32 e 0,10 – 2,00, respectivamente.

neo-SX		SX		MC	
Análogo	Afinidade (%)	Análogo	Afinidade (%)	Análogo	Afinidade (%)
neo-SX	100	SX	100	MC-LR	100
SX	11	neo-SX	0,8	MC-RR	73
dc-SX	<1	dc-SX	18	MC-YR	58
GTX2-3	<1	GTX2-3	12	MC-LA	2
GTX1-4	<0,1	GTX1-4	<0,1	MC-LF	3
dcGTX2-3	0,4	dcGTX2-3	0,4	MC-LW	4
dcneo-SX	0,7	dcneo-SX	0,7	-	-

CAPÍTULO 2

Efeitos distintos de extratos brutos com presença e ausência de microcistinas em duas linhagens de *Microcystis*.

Danilo Camargo-Santos¹, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira,^{1,2} Carlos Tadeu Santos Dias², Renato José Reis Molica³

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

³ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Author Correspondence: mbitt@usp.br

1 Resumo

A alelopatia consiste em efeito prejudicial ou benéfico provocado em plantas e algas pela liberação de uma ou mais substâncias no ambiente por microrganismos e outras plantas. Alguns estudos mostram que microcistinas (MC) provocam efeitos alelopáticos em seres fitoplanctônicos. Contudo, devido às altas concentrações aplicadas nesses estudos, as quais não são usualmente encontradas no ambiente ($<10\mu\text{g.L}^{-1}$), o tema ainda não está esclarecido. Esse estudo visa avaliar os possíveis efeitos alelopáticos de extratos brutos de *Microcystis aeruginosa*, com e sem MC, nas linhagens de cianobactérias *M. wesenbergii* (Komárek) Komárek BCCUSP11 e *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing BCCUSP232, em concentrações normalmente encontradas na natureza (0,5, 1,0; 5,0 e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC totais). Com 14 dias de duração, os experimentos, foram feitos sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo e luz ($24\pm 1^\circ\text{C}$, 14:10h claro:escuro e $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em câmaras climáticas, com cultivos em tréplica. Os extratos brutos MC+ e MC- foram adicionados no 4º dia, e seus efeitos foram avaliados através das variações nas densidades celulares dos cultivos. Foram medidas as concentrações de MC dos cultivos, no momento da adição do extrato bruto MC+ (e MC-, para *M. aeruginosa* BCCUSP232) e no fim de cada experimento através de teste ELISA. Os extratos brutos MC+ e MC- inibiram a densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11 nos tratamentos 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$. A densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232 foi estimulada apenas pelo tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC+. As concentrações finais de MC foram menores para *M. wesenbergii* BCCUSP11 e maiores para *M. aeruginosa* BCCUSP232, em todos os tratamentos, sendo que houve maior produção de MC no tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC-. Nós concluímos que não é possível generalizar a ação alelopática de MC, sendo que a resposta frente à toxina parece ser espécie-específica. Além disso, há substâncias presentes nos dois extratos brutos capazes de provocar efeitos alelopáticos. Por fim, os efeitos não são imediatos, sendo necessários no mínimo 4 dias para que a densidade celular mostre diferença significativa em relação ao controle.

2 Introdução

Microcistinas (MC) são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de cianobactérias e que causam inibição das fosfatases 1 e 2A em animais e vegetais (Machintosh et al, 1990; Kurki-Helasma e Meriluoto, 1998). Porém, o seu papel ecológico é ainda desconhecido e debatido pela sociedade científica (Gross, 2003).

Nesse contexto, Charmichael (1992) propôs que elas possam servir como defensivos químicos, enquanto Ütkilen e Gjolme (1995) defenderam que as MC atuassem no transporte de ferro na célula. Para Sedmak e Kosi (1998) elas funcionam como reguladores de crescimento populacional. Já Zilliges et al (2011) afirmam que a MC se liga a proteínas, aumentando a capacidade reprodutiva de seus produtores em condições de estresse ambiental. Schagerl et al (2002) e Leflaive e Ten-Hage (2007) propuseram que essas moléculas pudessem atuar como um fator biótico que favorecesse a dominância de cianobactérias, através de eventos alelopáticos em seres vivos, principalmente em fotoautotróficos aquáticos.

Segundo Rice (1984), a alelopatia consiste em um conjunto de interações bioquímicas, estimulantes ou inibitórias, entre bactérias, algas, fungos ou plantas em um organismo alvo. Já existem estudos sobre alelopatia envolvendo MC e organismos fotoautotróficos aquáticos, como macrófitas aquáticas (Pflugmacher, 2002; 2004; Romanowska-Duda & Tarczyska, 2002; Jang et al, 2007) e microalgas (Suikkanen et al, 2004; Sedmak & Elersek, 2006; Babica et al, 2007, Bártoová et al, 2011). Porém, muitos trabalhos, tais como Sedmak e Kosi (1998), Romanowska-Duda e Tarczyska (2002), Hu et al (2005) e Ou et al (2005) utilizaram em seus experimentos concentrações de MC maiores do que aquelas geralmente encontradas na natureza (sempre acima de $10\mu\text{g.L}^{-1}$).

Porém, segundo Babica *et al* (2006), trabalhos sobre alelopatia com MC são muito controversos, pois há diferenças importantes nas metodologias e poucos abordaram concentrações até $10\mu\text{g.L}^{-1}$. Assim, pode haver um erro de caracterização das MC, pois as conclusões sobre a alelopatia das MC muitas vezes foram obtidas baseadas em concentrações ecologicamente não relevantes (Leão et al, 2009). Por isso, o nosso objetivo é verificar os possíveis

efeitos alelopáticos de microcistinas, em diferentes concentrações próximas às encontradas na natureza, sobre o crescimento de duas espécies de *Microcystis*. Nossa hipótese é que, sob essas concentrações, as duas linhagens-alvos não sofrerão efeitos alelopáticos das MC.

3 Material e Métodos

3.1 Linhagens utilizadas e condições de cultivo

As linhagens-alvo utilizadas foram *Microcystis wesenbergii* BCCUSP11 (não produtora de MC, segundo Bittencourt-Oliveira et al, 2011) e *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 (produtora de MC, segundo Bittencourt-Oliveira, 2003) (Tabela 1). Todas as linhagens foram mantidas em meio líquido ASM-1, pH 7,4 (Guillard, 1973), em câmaras climáticas com intensidade luminosa ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medida com fotômetro LI-COR, modelo LI-250, com sensor esférico subaquático), fotoperíodo (14:10h, claro:escuro) e temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados.

3.2 Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias

Os extratos utilizados foram obtidos a partir das linhagens *M. aeruginosa* BCCUSP232, produtora de MC (MC+) e *M. aeruginosa* BCCUSP03, não produtora de MC (MC-), cultivando aproximadamente 20 litros de cada uma das linhagens nas condições supracitadas. Os cultivos foram centrifugados durante a fase exponencial de crescimento a 10.000 rpm, por 15 minutos à temperatura de 20°C . A biomassa resultante foi liofilizada e estocada em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

3.3 Determinação da concentração de MC no extrato MC+

As concentrações de MC totais por peso de massa seca do extrato bruto MC+ foram obtidas através de um teste ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), com kits em placa Beacon (Beacon Analytical Systems Inc., Portland, ME, USA) segundo recomendações do fabricante. A faixa de detecção é de 0,1 a 2,0 partes por bilhão (ppb), sendo utilizados os controles positivos e negativos do próprio kit. As análises foram feitas em triplicatas.

3.4 Preparação do extrato bruto aquoso e adição da MC nos cultivos

O extrato bruto aquoso foi preparado a partir de 0,11g de massa liofilizada de *M. aeruginosa* BCCUSP232 adicionados a 8mL de água deionizada autoclavada e ultrassonicada por cinco minutos a 15W e 22,5kHz (Microsom Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) para o rompimento das células. Dessa forma, foi obtida uma solução inicial contendo todos os compostos químicos presentes nas células, inclusive as MC totais, cuja concentração era igual a $6000\mu\text{g.L}^{-1}$. Então, essa solução inicial foi inserida (com as devidas diluições) nos cultivos para que as concentrações resultantes de MC totais nos cultivos fossem de $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$, $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para os tratamentos $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$, $1,0\mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-, o extrato bruto aquoso sem MC (a partir de *M. aeruginosa* BCCUSP03) foi preparado seguindo o mesmo procedimento.

3.5 Desenho experimental

Dois experimentos de 14 dias foram realizados expondo as linhagens-alvo *M. wesenbergii* BCCUSP11 e *M. aeruginosa* BCCUSP232 (Tabela 1), separadamente, aos extratos brutos aquosos com e sem MC totais, os quais foram adicionados no 4º dia de cultivo (inicial). Os cultivos foram realizados em câmaras climáticas idênticas com intensidade luminosa ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (14:10h, claro:escuro) e temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados. Para cada experimento foram utilizados erlenmeyers com 1.000mL de capacidade contendo 600mL de cultivo ASM-1 pH 7.4, os quais foram agitados manualmente e suas posições nas câmaras alteradas diariamente. Foram feitas réplicas para todos os tratamentos e controle ($n = 3$), com densidade celular inicial de $1,0 \times 10^5$ células por mililitro (cel.mL^{-1}). As concentrações de MC totais aplicadas nos cultivos constam na Tabela 1.

3.6 Cálculo da densidade celular

Para todos os tratamentos e controle, alíquotas de 2mL foram retiradas dos cultivos e imediatamente preservadas com lugol 10%, em fluxo laminar, a

cada dois dias, a partir de 48 horas após o inóculo inicial. A estimativa da densidade celular dos cultivos foi realizada com contagens em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico, segundo Guillard (1973). Para maior confiabilidade dos resultados, o mínimo de 400 células foi quantificado para uma estimativa de erro em torno de 10% (Lund et al, 1958). Independente do número de células estimado, três câmaras foram contadas. A densidade celular foi expressa em cél.mL^{-1} .

3.7 Determinação da concentração de MC dos cultivos

Imediatamente após a adição do extrato bruto aquoso MC+ no experimento com *M. wesenbergii* BCCUSP11 (no 4º dia de experimento) nos cultivos (Tabela 1), foram retiradas alíquotas de 1mL para a análise da concentração aplicada de MC totais (inicial). No 14º dia foram retiradas alíquotas de 1 mL para obter as concentrações de MC totais no final do experimento (final). No experimento com a linhagem-alvo *M. aeruginosa* BCCUSP232, Por se tratar de uma linhagem produtora de MC, as alíquotas foram retiradas dos cultivos dos tratamentos MC+ e MC-. As amostras foram mantidas em freezer -80°C, e no momento da análise foram descongeladas e ultrassonicadas por 3 minutos (15W e 22,5kHz) para a lise celular. A determinação das concentrações de MC totais foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), conforme o item 3.3.

3.8 Análise estatística

Os dados de densidade celular e concentração inicial e final de MC totais obtidos nos experimentos foram submetidos a um teste de normalidade e homocedasticidade, com posterior análise de variância “one-way” (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0,05$). Para a densidade celular, foram averiguadas as diferenças significativas entre os diferentes tratamentos a cada dia, isoladamente, dentro de cada experimento. Já para as concentrações de MC totais, foram verificadas as diferenças significativas entre o dia da aplicação do extrato (4º de experimento) e o dia final dos experimentos (14º dia).

4 Resultados

Os extratos MC+ e MC- provocaram efeitos alelopáticos específicos na densidade celular de cada linhagem estudada. Houve efeito inibitório na linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11 por MC+ e MC- (Figura 1), enquanto que *M. aeruginosa* BCCUSP232 foi estimulada pelo extrato MC+ (Figura 2).

M. wesenbergii BCCUSP11 (Figura 1) sofreu efeito alelopático inibitório em sua densidade celular provocado pelos extratos MC+ e MC- nas concentrações de 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$, com valores significativamente menores ($p < 0,05$) em relação ao controle a partir do 8º dia. Para a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232 (Figura 2) foi registrada densidade celular significativamente maior apenas do tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC+, após o 6º dia de experimento. Os outros tratamentos foram estatisticamente iguais ao controle.

A análise por ELISA mostrou que as concentrações de MC totais nos experimentos com a linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11 (Figura 3A) foi sempre menor no 14º dia. Somente não houve diferença significativa entre as concentrações de MC do dia de aplicação do extrato MC+ e do fim do experimento para o tratamento 0,5 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC+, cujo decaimento da concentração foi de 29% (Tabela 1).

Por outro lado, as concentrações de MC totais no experimento envolvendo a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232 (com adição dos extratos MC+ e MC-) foram sempre maiores no último dia do experimento em relação ao dia da adição dos extratos para todos os tratamentos (Figura 3B e 3C). Porém, apenas os tratamentos 1,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 5,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC- não apresentaram diferenças significativas entre o 4º e 14º dia de experimento, com acréscimos da concentração de 31% e 3%, respectivamente. O extrato MC- estimulou mais a produção de MC, pois a maior concentração final de MC foi registrada para o seu tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 1).

5 Discussão

Não houve um padrão de resposta alelopática na densidade celular das duas linhagens de cianobactérias utilizadas em nossos experimentos. *M. aeruginosa* BCCUSP232 (produtora de MC) foi estimulada pelo extrato MC+, enquanto *M. wesenbergii* BCCUSP11 foi inibida pelos extratos MC+ e MC-. Nossos resultados são semelhantes aos de outros estudos, como Sedmak e Kosi (1998), Babica et al (2007), Oberhaus et al (2008), El-Sheekh et al (2010), Lopes e Vasconcelos (2011) e Leão et al (2012), que também registraram efeitos distintos em diferentes linhagens-alvo fitoplanctônicas, causados pela MC e/ou por compostos originados de organismos potencialmente produtores de MC.

O resultado do experimento com *M. aeruginosa* BCCUSP232 mostra que a presença das MC, no tratamento onde foi adicionado $10\mu\text{g.L}^{-1}$ da toxina, foi capaz de provocar um efeito positivo em sua própria densidade celular, uma vez que todos os tratamentos com o extrato MC- não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Sedmak e Kosi (1998) afirmam que concentrações mais altas de MC estimulam ainda mais o crescimento dessa espécie de cianobactéria. Esses autores encontraram resultados semelhantes, porém com concentrações mais altas, onde *M. aeruginosa* teve seu crescimento estimulado na presença de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR.

Os resultados dos experimentos com *M. wesenbergii* BCCUSP11 mostram que outras substâncias, que não MC, presentes nos extratos MC+ e MC- são capazes de provocar efeitos alelopáticos na densidade celular dessa linhagem após um determinado período de exposição aos extratos. Porém, não é possível afirmar que os efeitos provocados nessas duas linhagens tenham sido causados pelas mesmas substâncias químicas.

A utilização de extratos brutos de *M. aeruginosa* nos experimentos simula as condições naturais de um ecossistema aquático onde há lise celular de cianobactérias (Pietsch et al, 2001) e concomitante liberação de várias substâncias, inclusive MC. Com isso, as linhagens-alvo utilizadas nos experimentos foram expostas a diversos compostos produzidos pelas linhagens de *M. aeruginosa* que geraram os extratos MC+ e MC-. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que as MC estão envolvidas no aumento

da densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232, embora outros compostos possam também ter provocado essa resposta, inclusive em conjunto com as MC.

Efeitos estimulatórios provocados por compostos produzidos por cianobactérias também foram obtidos em alguns estudos: Suikkanen et al (2005), utilizando filtrados de três cianobactérias em cultivo de comunidade fitoplanctônica, relataram aumento no crescimento de *Snowella* spp. e *Anabaena* spp.; El-Sheekh et al (2010) reportaram estímulo ao crescimento de *Oscillatoria angustissima* e *Anabaena* sp. por parte de filtrados de *M. aeruginosa* contendo MC; Neisch et al (2012) apresentou estímulo no crescimento de *Prymnesium parvum* ao utilizar exudatos de *Anabaena* sp.; e Leão et al (2012), utilizando exudatos de *Oscillatoria* sp. em uma comunidade fitoplanctônica cultivada em laboratório, registraram estímulo no crescimento de duas cianobactérias da ordem Oscillatoriales.

Por outro lado, a redução da densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11 pelo extrato MC- mostra que outros compostos produzidos por cianobactérias, sem ser MC, também são capazes de provocar efeito alelopático. Efeitos inibitórios diversos provocados por MC ou organismos produtores de MC em outros gêneros de microalgas já foram reportados na literatura: Suikkanen et al (2004) registraram efeitos alelopáticos inibitórios causado por linhagens produtoras e não produtoras de hepatotoxinas (*Nodularina spumigena*) em *Rhodomonas* sp. e *Thalassiosira weissflogii*. Pietsch et al (2001) relataram aumento de estresse oxidativo e inibição da fotossíntese de *Scenedesmus armatus*, mas utilizando extrato de cianobactérias contendo MC. Vassilakaki e Pflugmacher (2008), ao utilizar um extrato bruto de *M. aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae* contendo $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC, aumentou o estresse oxidativo de *Synechocystis* sp. Já Bártová et al (2011) registraram uma queda na diferenciação celular de acinetos e heterócitos em *Trichormus variabilis* ao expor essa cianobactéria à um extrato de *Microcystis* contendo MC.

É importante salientar que nosso estudo apenas aferiu a variação na densidade celular das duas linhagens-alvo. Isso quer dizer que pode ter ocorrido outros tipos de efeitos alelopáticos, como estresse oxidativo ou

inibição da fotossíntese, que não foram detectados em nosso trabalho pelo fato de não ser o foco do estudo.

Outro ponto interessante de nossos resultados foi o tempo necessário para que os efeitos fossem detectados. De forma geral, foi possível verificar que a resposta alelopática surge, no mínimo, no 8º dia (quatro dias após a adição dos extratos) em todos os experimentos. El-Sheekh et al (2010) registraram um período médio de três dias para que filtrados de *Microcystis* contendo MC provocasse efeitos alelopáticos em suas linhagens-alvo. Segundo Schagerl et al (2002), a presença de MCs não afeta inicialmente o crescimento de algumas linhagens de algas, mas em pouco tempo a resposta se torna evidente.

As concentrações de MC no experimento com *M. wesenbergii* BCCUSP11, para os tratamentos MC+, foram menores no fim do experimento em relação ao dia da adição do extrato MC+, tendo um decaimento mínimo de 29% (tratamento 0,5 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$). Esse resultado já era esperado, pois, segundo Bittencourt-Oliveira et al (2011), essa linhagem não é produtora de MC. Como essas moléculas são peptídeos cíclicos muito estáveis, sua degradação química é lenta, com meia vida em torno de 10 semanas (Chorus e Bartram, 1999), promovida principalmente pela luz (Dawson, 1998). Por isso, embora possa ter ocorrido a degradação química, a redução da concentração de MC nos cultivos deve ter sido causada, principalmente, por bactérias (Cousins et al, 1996; Ho et al, 2012), já que os cultivos não foram axênicos, ou até mesmo metabolização por parte das linhagens-alvo. Ainda assim, mesmo com a redução das concentrações, houve efeitos alelopáticos causados pelo extrato MC+ nessa linhagem.

Por outro lado, a concentração de MC no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232 foi maior no fim do experimento em relação ao dia de adição dos extratos MC+ e MC-, o que também era esperado, pois trata-se de uma linhagem produtora de MC (Bittencourt-Oliveira, 2003). O acréscimo de MC obtido para 0,5 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC+ foi muito alto devido à baixa concentração inicial dos cultivos. Por outro lado, a maior concentração de MC nesse experimento foi registrada no 14º dia no tratamento 10 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o extrato MC-.

Assim, embora o aumento da densidade celular tenha sido estimulado somente pelo extrato MC+, esse resultado sugere que compostos presentes também no extrato MC- foram capazes de aumentar a produção de MC por essa cianobactéria. Portanto, *M. aeruginosa* também pode aumentar a produção de MC na presença de substâncias liberadas pela lise celular de linhagens não tóxicas de sua própria espécie. Em outras palavras, linhagens não tóxicas de *M. aeruginosa* podem contribuir para que uma floração dessa cianobactéria, com indivíduos produtores e não produtores de MC, seja mais tóxica e, portanto, mais nociva ao ecossistema aquático.

Portanto, baseado em nossos resultados e na literatura disponível, não é possível generalizar a função alelopática de MC em concentrações normalmente encontradas na natureza. Embora Suikkanen et al (2004) e B-Beres et al (2012) tenham afirmado que as MC parecem não estar envolvidas em relações alelopáticas, Sedmak e Elersek (2006) disseram que o papel ecológico das MC pode ser diferente para indivíduos produtores e aqueles que tenham contato com a toxina no ambiente aquático. Por isso, é possível que as MC façam parte de vias de comunicação desconhecidas entre diferentes espécies de cianobactérias (Vassilakaki & Pflugmacher, 2008) e outros seres da comunidade fitoplanctônica ao interagir com outras substâncias e/ou fatores abióticos, favorecendo assim a dominância de cianobactérias (B-Beres et al, 2012).

Isso poderia explicar, em parte, o estímulo no aumento da densidade celular da linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232 em nossos experimentos. Em outras palavras, a liberação de MC no meio aquático, juntamente com outros compostos produzidos por *M. aeruginosa*, poderia estimular o aumento da densidade celular dessa cianobactéria, gerando um quadro favorável para o estabelecimento de uma floração potencialmente tóxica.

Concluindo, nosso estudo mostra que cada espécie fitoplanctônica pode sofrer efeitos alelopáticos distintos frente a MC, em concentrações normalmente encontradas na natureza, e outros compostos liberados por *M. aeruginosa*, o que anula a nossa hipótese. Além disso, a resposta alelopática frente a esses compostos não é imediata, ficando evidente depois de pelo menos quatro dias de exposição. Por fim, a resposta frente às MC e/ou outras substâncias parece ser espécie-específicas.

6 Referências Bibliográficas

B-BÉRES, V.; GRIGORSZKY, I.; VASAS, G.; BORICS, G.; VÁRBÍRÓ, G.; NAGY, S. A.; BORBÉLY, G.; BACSI, I. (2012). The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages? **Hydrobiologia**. Vol. 691. p. 97-107.

BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, Vol. 42. p. 9 – 20.

BABICA, P.; HILSCHEROVA, K.; BARTOVA, K.; BLAHA, L.; MARSALEK, B. (2007). Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. **Phycologia**. Vol. 46. p. 137 – 142.

BÁRTOVÁ, K.; HILSCHEROVÁ, K.; BABICA, P.; MARŠÁLEK, B. (2011). Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**. N. 23. p. 967 – 973.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. (2003). Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**. N. 2. p. 51 – 60.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; PINTO, E. (2011). Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Biology**. N. 71. p. 209 – 216.

CARMICHAEL, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**. N. 72. p. 445 – 459.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) (1999). **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London. E&FN Spon. 416p.

COUSINS, I. T.; BEALING, D. J.; JAMES, H. A.; SUTTON, A. (1996). Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. **Water Research**. N. 30. p. 481 – 485.

DAWSON, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. **Toxicon**. N. 7. p. 953 – 962.

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; EL-SHENODY, R. A. (2010). Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. **Allelopathy Journal**. N. 26. Vol. 2. p. 275 – 290.

GROSS, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Vol. 22. p. 313 – 339.

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

HO, L.; TANG, T.; MORRIS, P. T.; HOEFEL, D. (2012). Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. **Chemosphere**. N. 87. p. 1149 – 1154.

HU, Z. Q.; LIU, Y. D.; LI, D. H.; DAUTA, A. (2005). Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. **Hydrobiologia**. Vol. 534. p.23 – 9.

JANG, M.; HA, K.; TAKAMURA, N. (2007). Reciprocal allelopathic responses between toxic Cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). **Toxicon**. Vol. 49. 727 – 733.

KURKI-HELASMO, K.; MERILUOTO, J. (1998). Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. **Toxicon**. Vol. 36. p. 1921 – 1926.

LEÃO, P. N.; RAMOS, V.; VALE, M.; MACHADO, J. P.; VASCONCELOS, V. M. (2012). Microbial community elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. **Environmental Microbiology**. N. 63. p. 85 – 95.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. (2009). Allelopathy in freshwater cyanobacteria. **Critical Reviews in Microbiology**. N. 35. p. 271 – 282.

LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. (2007). Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**. N. 52. p. 199 – 214.

LOPES, V. R.; VASCONCELOS, V. M. (2011). Bioactivity of benthic and picoplanktonic estuarine cyanobacteria on growth of photoautotrophs: Inhibition versus stimulation. **Marine drugs**. N. 9. p. 790 – 802.

LUND, J. W. G., KIPLING, C. & LE CREN, E. D. (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**. N. 11. p. 143 -170.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letter**. N. 264. p. 187 - 192.

NEISCH, M. T.; ROELKE, D. L.; BROOKS, B. W.; GROVER, J. P.; MASSER, M. P. (2012). Stimulating effect of *Anabaena* sp. (Cyanobacteria) exudates on *Prymnesium parvum* (Haptophyta). **Journal of Phycology**. N. 48. p. 1045 – 1049.

OBERHAUS, L.; BRIAND, J.; HUMBERT, J. (2008). Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. **FEMS Microbiology Ecology**. N. 66. p. 243 – 249.

OU, D. Y.; SONG, L. R.; GAN, N. Q.; CHEN, W. (2005). Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poterioochromonas* sp. **Environmental Toxicology**. Vol. 20. p. 373 – 80.

PFLUGMACHER, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**. Vol. 17. Issue 4. p. 407-413.

PFLUGMACHER, S. (2004). Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**. Vol. 70. Issue 3. p. 169-178.

PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AME, M. V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. (2001). The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environmental Toxicology**. Vol.16. p. 535 – 42.

RICE, E. I. (1984). **Allelopathy**. Academic Press. Orlando.

ROMANOWSKA-DUDA, Z.; TARCZYŃSKA, M. (2002). The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. **Environmental Toxicology**. Vol. 17. p. 434 – 440.

SCHAGERL, M.; UNTERRIEDER, I.; ANGELER, D. G. (2002). Allelopathy among Cyanoprokaryota and other algae originating from lake Neusiedlersee (Austria). **International Review of Hydrobiology**. N. 87. p. 365 – 374.

SEDMAK, B.; ELERŠEK, T. (2006). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. **Microbial Ecology**. Vol. 51. p. 508 – 515.

SEDMAK, B.; KOSI, G. (1998). The role of microcystin in heavy cyanobacterial bloom formation. **Journal of Plankton Research**. Vol. 20. N. 4. p. 691 – 708.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. (2004). Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *aphanizomena flos-aquae* and *Anabaena lemmermanni* on algal monocultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Vol. 308. p. 85 – 101.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. (2005). Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. **Marine Ecology Progress Series**. Vol. 287. p. 1 – 9.

VASSILAKAKI, M.; PFLUGMACHER, S. (2008). Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. **Journal of Applied Phycology**. Vol. 20. 219 – 225.

UTKILEN, H.; GJOLME, N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 61. p. 797 – 800.

ZILLIGES, Y.; KEHR, J.; MEISSNER, S.; ISHIDA, K.; MIKKAT, S.; HAGEMANN, M.; KAPLAN, A.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. **Plos One**. Vol. 6. Issue 3. p. 1 – 11.

7 Anexos

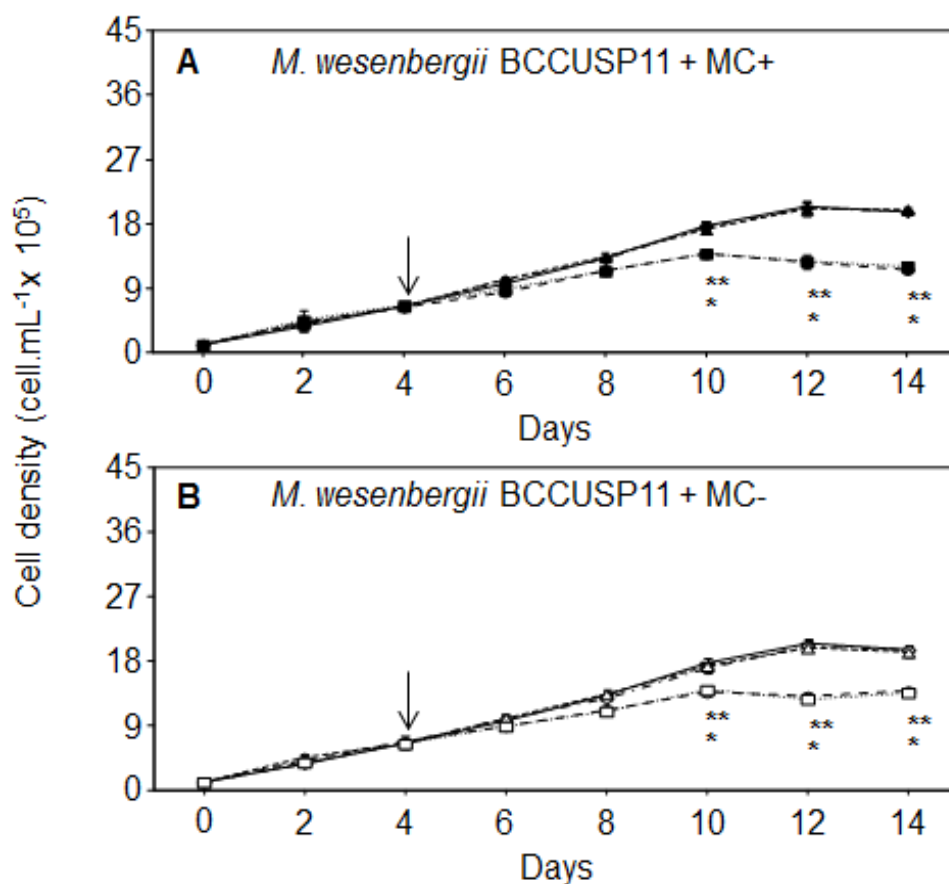


Figura 1. Densidade celular de *M. wesenbergii* BCCUSP11. A: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP232 MC+. B: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP03 MC-. Controle (—), 0,5 MC+ µg.L⁻¹ (—◆—), 0,5 MC- µg.L⁻¹ (—◇—), 1,0 MC+ µg.L⁻¹ (—▲—), 1,0 MC- µg.L⁻¹ (—△—), 5,0 MC+ µg.L⁻¹ (—●—), 5,0 MC- µg.L⁻¹ (—○—), 10,0 MC+ µg.L⁻¹ (—■—), 10,0 MC- µg.L⁻¹ (—□—). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 5,0 MC µg.L⁻¹ e controle (*) e entre os tratamentos 10,0 MC µg.L⁻¹ e controle (**). Os extratos MC+ e MC- provocaram efeito alelopático na densidade celular em seus respectivos tratamentos 5,0 MC µg.L⁻¹ e 10,0 MC µg.L⁻¹ após o 6º dia.

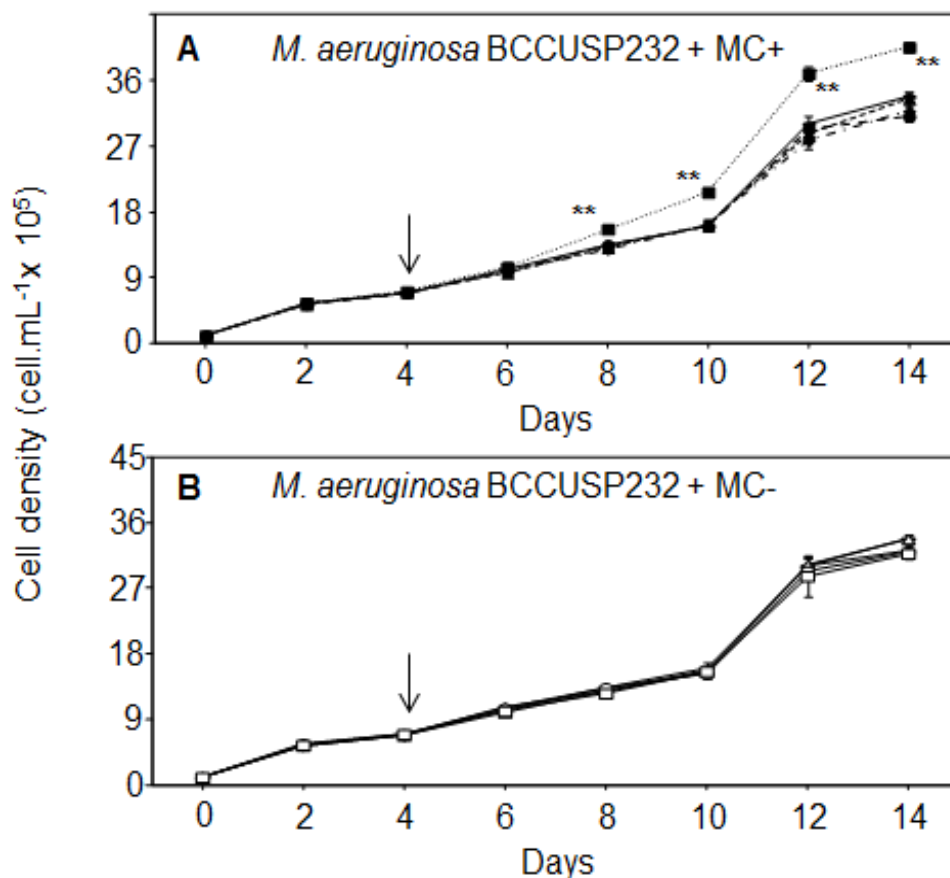


Figura 2. Densidade celular de *M. aeruginosa* BCCUSP232. A: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP232 MC+. B: Tratamentos com o extrato *M. aeruginosa* BCCUSP03 MC-. Controle (—), 0,5 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◆·), 0,5 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-◇·), 1,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-▲-), 1,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-△-), 5,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-●-), 5,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-○-), 10,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··■··), 10,0 MC- $\mu\text{g.L}^{-1}$ (··□··). Adição dos extratos (Seta). Diferença significativa de densidade celular entre o tratamento 10,0 MC+ $\mu\text{g.L}^{-1}$ e controle (**). O extrato MC+ aumentou a densidade celular do tratamento 10,0 MC $\mu\text{g.L}^{-1}$ após o 6º dia.

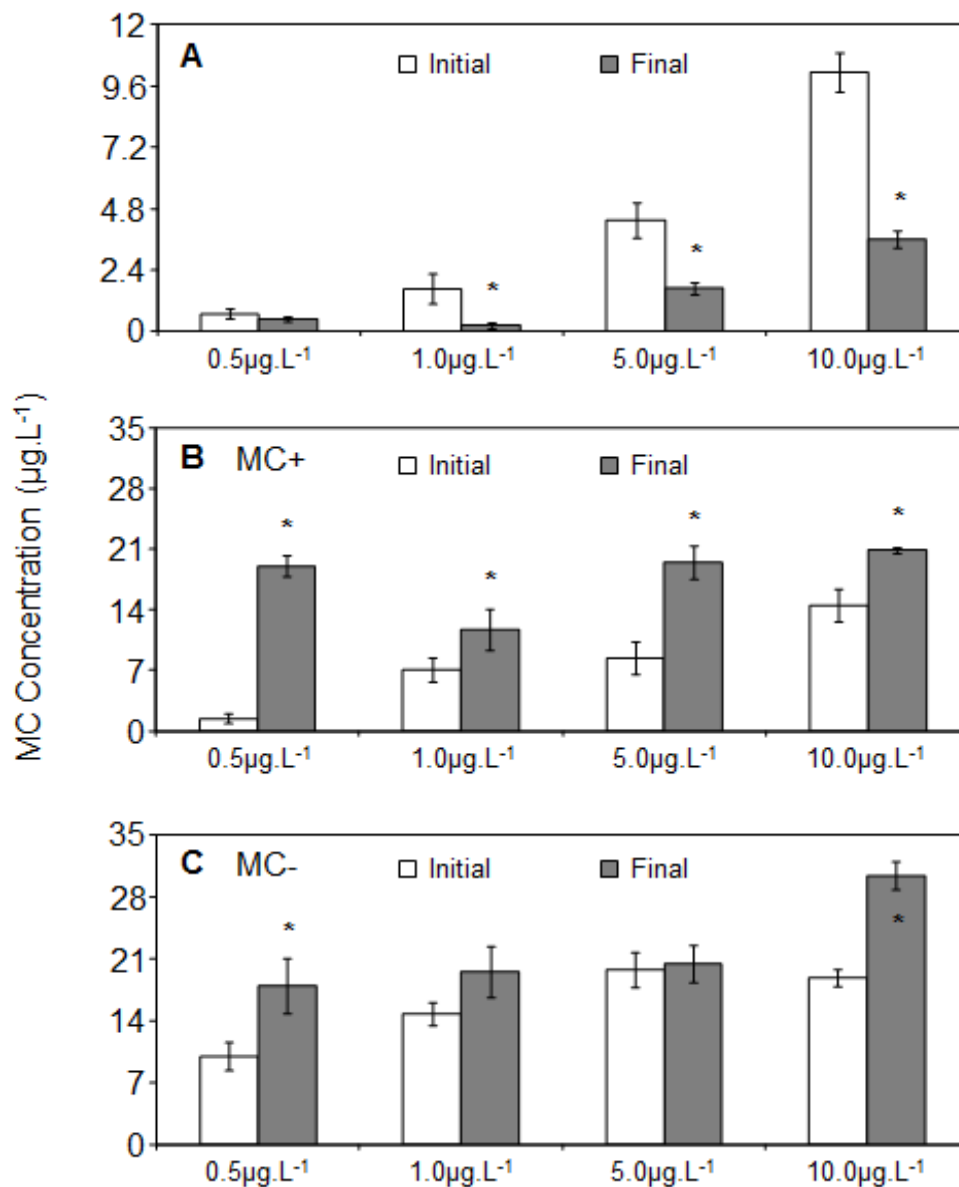


Figura 3. Concentrações iniciais e finais de MC nos experimentos. A: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC+ no experimento com a linhagem *M. wesenbergii* BCCUSP11. B: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC+ no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. C: Concentração de MC nos tratamentos com o extrato MC- no experimento com a linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferença significativa de concentração de MC entre o dia da aplicação do extrato (4º dia) e o fim do experimento (*). Para *M. wesenbergii* BCCUSP11, Não houve diferença significativa para as concentrações de MC apenas no tratamento 0,5 MC µg.L⁻¹ do extrato MC+. Para *M. aeruginosa* BCCUSP232, não houve diferença significativa para as concentrações de MC apenas nos tratamentos 1,0 MC µg.L⁻¹ e 5,0 MC µg.L⁻¹ do extrato MC-.

Tabela 1. Tratamentos realizados com as linhagens-alvo (*Microcystis wessenbergii* BCCUSP11 e *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232) e extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 (MC+) e BCCUSP03 (MC-). Concentrações de MC totais dos extratos brutos (MC+ e MC-), concentrações iniciais (4º dia) e finais (14º dia) de MC obtidas por ELISA ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nos cultivos em cada tratamento. Porcentagem de decréscimo (-) (para *M. wessenbergii* BCCUSP11) e acréscimo (+) (para *M. aeruginosa* BCCUSP232) da concentração inicial de MC. BCCUSP: *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*. Não se aplica (NA).

Linhagem alvo	Extrato bruto	Concentrações de MC Totais		Concentrações Iniciais de MC totais		Concentrações Finais de MC totais		Decréscimo (-) ou Acréscimo (+) (%)	
		0,5	1,0	0,695 \pm 0,181	1,664 \pm 0,586	0,488 \pm 0,108	0,227 \pm 0,103	-29%	-86%
<i>M. wessenbergii</i> BCCUSP11	<i>M. aeruginosa</i> BCCUSP232 (MC+)	1,0	5,0	4,356 \pm 0,683	1,677 \pm 0,237	1,677 \pm 0,237	1,677 \pm 0,237	-61%	
		10,0	10,0	10,137 \pm 0,768	3,610 \pm 0,347	3,610 \pm 0,347	3,610 \pm 0,347	-64%	
		0,5	1,0						
		5,0	10,0						
<i>M. aeruginosa</i> BCCUSP232	<i>M. aeruginosa</i> BCCUSP03 (MC-)	10,0	10,0						
		0,5	1,0	1,426 \pm 0,564	19,037 \pm 1,229	19,037 \pm 1,229	19,037 \pm 1,229	+1234%	
		1,0	5,0	7,059* \pm 1,357	11,733 \pm 2,391	11,733 \pm 2,391	11,733 \pm 2,391	+66%	
		5,0	10,0	8,417* \pm 1,893	19,465 \pm 1,945	19,465 \pm 1,945	19,465 \pm 1,945	+131%	
		0,5	1,0	14,520* \pm 1,914	20,848 \pm 0,307	20,848 \pm 0,307	20,848 \pm 0,307	+43%	
		1,0	5,0	9,963 \pm 1,578	17,981 \pm 3,069	17,981 \pm 3,069	17,981 \pm 3,069	+80%	
		5,0	10,0	14,823 \pm 1,312	19,552 \pm 2,842	19,552 \pm 2,842	19,552 \pm 2,842	+31%	
		10,0	10,0	19,726 \pm 1,974	20,448 \pm 2,111	20,448 \pm 2,111	20,448 \pm 2,111	+3%	
		18,878 \pm 1,006	30,436 \pm 1,545	30,436 \pm 1,545	30,436 \pm 1,545	+61%			

