

PRISCILA RODRIGUES KOSCHEK

INTERAÇÃO ENTRE *MONORAPHIDIUM* E
MICROCYSTIS CRESCIDAS EM MEIO COM MATÉRIA
ORGÂNICA EXCRETADA
E EM CULTIVO MISTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Priscila Rodrigues Koschek

INTERAÇÃO ENTRE *MONORAPHIDIUM* E
MICROCYSTIS CRESCIDAS EM MEIO COM
MATÉRIA ORGÂNICA EXCRETADA
E EM CULTIVO MISTO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biofísica)

Orientadora: Dra. Sandra M. F. O. Azevedo

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Koschek, Priscila Rodrigues.

Interação entre *Monoraphidium* e *Microcystis* crescidas em meio com matéria orgânica excretada e em cultivo misto / Priscila Rodrigues Koschek. Rio de Janeiro, 2008.

IX, 85 p.: 40 figuras e 8 tabelas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, 2008.

Orientadora: Dra. Sandra M. F. O. Azevedo

1. *Microcystis*. 2. *Monoraphidium*. 3. Cultivo misto.
4. Microcistinas. 5. Exudato. 6. Infoquímicos.

I. Azevedo, Sandra M. F. O. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) III. Interação entre *Monoraphidium* e *Microcystis* crescidas em meio com matéria orgânica excretada e em cultivo misto.

Priscila Rodrigues Koschek

INTERAÇÃO ENTRE *MONORAPHIDIUM* E *MICROCYSTIS* CRESCIDAS EM MEIO
COM MATÉRIA ORGÂNICA EXCRETADA E EM CULTIVO MISTO

Rio de Janeiro,..... de dezembro de 2008

Orientadora:

(Dra. Sandra M. F. de Oliveira e Azevedo, IBCCF - UFRJ)

Avaliadores:

(Dra. Valeria Freitas de Magalhães, IBCCF - UFRJ)

(Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage, IBCCF - UFRJ)

(Dra. Lucia Helena S. da Silva, Museu Nacional - UFRJ)

Revisora:

(Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco - UFRJ)

Agradecimentos

- ❑ Sempre a Deus pela sua presença.
- ❑ Aos meus pais Nelio e Neusa pela dedicação, compreensão e por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.
- ❑ Ao meu irmão Anderson pelo companheirismo.
- ❑ A todos os meus amigos que me incentivaram a buscar meus objetivos.
- ❑ À minha orientadora Sandra por ter me dado a oportunidade de estar nesse grupo de trabalho e ter contribuído para minha formação científica.
- ❑ À professora Valéria, Andréia, Elis e Ronaldo pela amizade e colaboração em todos os momentos que precisei aprender sobre cultivo, HPLC e análises de dados, especialmente no início dessa etapa.
- ❑ Ao Ricardo, Roberta, Levi e Bil pelo suporte técnico, disponibilidade e amizade.
- ❑ À prof.^a Ana Beatriz pela atenciosa revisão da dissertação
- ❑ A todos os colegas de trabalho e professores do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF pelo período de agradável convivência, pela compreensão e por terem me ajudado sempre quando precisei: Ramon, Beta, Pedro, Maria, Vítor, Bobby, Raquel, Ana Carla, Bel, Rodrigo, Simone, Luana, Carol, Suzane, prof. Luis Otávio, prof.^a Ana Lúcia e prof.^a Ana Cláudia.
- ❑ À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Interação entre *Microcystis* e *Monoraphidium* crescidas em meio com matéria orgânica excretada e em cultivo misto

A comunicação inter-específica pode ter um papel importante no crescimento dos organismos fitoplanctônicos e também na produção de toxinas pelas cianobactérias. Estas são freqüentemente encontradas como grupo dominante devido ao crescente processo de eutrofização nos ambientes aquáticos. No Reservatório do Funil (Resende-RJ), dados de pelo menos uma década já demonstraram que mais de 90% da biomassa fitoplanctônica pode ser composta pelo grupo das cianobactérias, das quais *Microcystis* é um dos principais gêneros dominantes. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a interação entre uma cepa da clorofícea *Monoraphidium*, isolada desse ambiente, e quatro cepas de *Microcystis*. Para isso foram realizados cultivos utilizando meio com matéria orgânica excretada (exudato) de culturas monoespecíficas ou de cultivos mistos em diferentes concentrações. Foram realizados cultivos mistos entre a clorofícea e uma cepa de *Microcystis* tóxica (MIRF-01), isolada do mesmo reservatório, ou outra cepa de *Microcystis* não tóxica (MICD-01), isolada de outro ambiente. O estado fisiológico foi acompanhado pela contagem de células e análise de clorofila *a*. A produção de microcistinas foi analisada pela técnica de HPLC. Os dados obtidos mostraram que o exudato de *Microcystis* não teve efeito inibitório sobre o crescimento de *Monoraphidium* com aeração, exceto na concentração de 10% no caso do exudato de uma dentre duas cepas testadas de *Microcystis*. Já em cultivos sem aeração, o crescimento de *Monoraphidium* foi estimulado pelo exudato (50%) de uma cepa de *Microcystis*, MIRF-01, dentre três cepas testadas. Esse efeito foi acompanhado de redução de concentração de clorofila *a*. A adição de exudato de culturas de *Monoraphidium* induziu o crescimento de uma dentre duas cepas de *Microcystis* testadas, sem alterar clorofila *a*. Em cultivo misto, tanto *Monoraphidium* quanto *Microcystis* apresentaram menor crescimento que em cultivos monoespecíficos e a clorofícea obteve melhor crescimento com a cepa de *Microcystis* MIRF-01 do que com a cepa MICD-01. Na presença de 100% do exudato de cultivo misto inoculado com 70% de *Monoraphidium* e 30% de *Microcystis* ocorreu inibição do crescimento de *Monoraphidium* e redução de clorofila *a*, caracterizando clorose ao final do cultivo (6 dias). No caso de *Microcystis* a adição de 50% deste exudato tendeu a inibir o crescimento, sem variação de clorofila *a*. A concentração de microcistinas não se alterou em cultivo misto com *Monoraphidium*, mas aumentou utilizando-se exudato de cultivos monoespecíficos de *Monoraphidium* e de cultivos mistos em que *Monoraphidium* predominava. Embora a função das microcistinas nesta interação ainda não esteja clara, o estudo contribui para reforçar a importância de infoquímicos na produção dessa cianotoxina. Portanto, os dados mostram que a produção de matéria orgânica excretada por essas espécies varia em função das condições de crescimento. Além disso, pode ter um papel controlador sobre o metabolismo dessas espécies a nível inter-específico e possivelmente intra-específico.

ABSTRACT

Interaction between *Microcystis* and *Monoraphidium* using medium with released organic matter and mixed cultures

Interspecific communication has an important role in phytoplankton growth and this may be true also for toxin production by cyanobacteria. This group of microorganisms is frequently found as dominant due to eutrophication processes in aquatic environments. Data from Funil Reservoir (Resende-RJ) have demonstrated that at least 90% of phytoplanktonic biomass can be composed of cyanobacteria. *Microcystis* is one of the main dominant genera. The present study was designed to investigate the interaction between one strain of the chlorophyte *Monoraphidium*, isolated from that reservoir, and four strains of *Microcystis*. Cultivation using medium with released organic matter (exudate) from monospecific cultures and also from mixed cultures, in different proportions, was performed. Mixed cultures included the chlorophyte and one toxic strain of *Microcystis* (MIRF-01) isolated from the same environment or another non toxic strain of *Microcystis* (MICD-01) isolated from a different environment. Physiological conditions of strains were followed by cell counting and by analysis of chlorophyll *a*. The variation in microcystins production was evaluated by HPLC technique. The results showed that medium with exudates from monospecific cultures of *Microcystis* did not inhibit growth of *Monoraphidium* with aeration, except for the 10% concentration exudates, and that occurred in one of the two strains of *Microcystis* tested. However, in cultivation without aeration the chlorophyte had its growth stimulated by exudate (50%) from one in three *Microcystis* strains tested. In addition, this stimulatory effect also involved reduction in chlorophyll *a*. The addition of exudates from *Monoraphidium* induced growth of one in two *Microcystis* strains tested, without changes in chlorophyll *a*. In conditions of mixed cultivation, *Monoraphidium* as well as *Microcystis* showed reduced growth as compared to monospecific cultures and the chlorophyte showed increased growth with *Microcystis* MIRF-01 strain as compared to MICD-01 strain. In the presence of 100% exudate from mixed cultivation inoculated with 70% *Monoraphidium* and 30% *Microcystis* the growth of *Monoraphidium* was inhibited with reduction of chlorophyll *a*, characterizing chlorosis at the end of cultivation (6 days). For *Microcystis*, the addition of this same exudate (50%) tended to inhibit cellular growth without affecting chlorophyll *a*. Microcystins concentration did not change in mixed cultures with *Monoraphidium*, however it increased using medium with exudates from *Monoraphidium* monospecific cultures or from mixed cultures in which *Monoraphidium* predominated. Although the function of microcystins in this interaction is still not clear, this study contributes to enforce the importance of infochemicals for this cyanotoxin production. Therefore, data show that organic matter released by these species varies in relation to growth conditions. Besides, it may have a controlling role in their metabolism at inter-specific and possibly intra-specific level.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Interações fitoplanctônicas e estratégias de crescimento.....	1
1.2	Fatores que influenciam a dominância de cianobactérias.....	4
1.3	Comunicação celular por meio de infoquímicos.....	7
1.4	Fatores que influenciam a produção de microcistinas.....	10
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	METODOLOGIA.....	14
3.1	<u>Cepas utilizadas</u>	14
3.2	<u>Condições de cultivo de células</u>	16
3.3	<u>Contagem de células</u>	16
3.4	<u>Determinação da concentração de clorofila <i>a</i></u>	17
3.5	<u>Determinação da concentração de microcistinas</u>	17
3.6	<u>Tratamento estatístico dos dados</u>	20
3.7	<u>Experimentos de interação entre <i>Monoraphidium</i> e <i>Microcystis</i></u>	20
3.7.1	Avaliação de características ecofisiológicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 e MICD-01) e de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) em condições monoespecíficas.....	20
3.7.2	Obtenção do meio com matéria orgânica excretada (exudato).....	21
3.7.3	Avaliação de características ecofisiológicas de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença do meio com exudato de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01).....	21
3.7.4	Avaliação de características ecofisiológicas de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença do meio com exudato de diferentes cepas tóxicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01, MILJ-04 ou MILJ-48).....	22
3.7.5	Avaliação de características ecofisiológicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) na presença do meio com exudato de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01).....	22
3.7.6	Avaliação do crescimento das cepas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) e da cepa de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) em condições de cultivo misto.....	23
3.7.7	Avaliação de características ecofisiológicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01) e de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença do meio com exudatos de cultivos mistos.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	<u>Características ecofisiológicas das cepas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 e MICD-01) e da cepa de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) em condições monoespecíficas</u>	26
4.1.1	Crescimento celular.....	26
4.1.2	Produção de clorofila <i>a</i>	29
4.1.3	Produção de microcistinas pela cepa de <i>Microcystis</i> MIRF-01.....	31
4.2	<u>Características ecofisiológicas de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença do meio com exudato das cepas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01)</u>	33
4.2.1	Crescimento celular.....	33

4.2.2	Produção de clorofila <u>a</u>	38
4.3	<u>Características ecofisiológicas de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença do meio com exudato de diferentes cepas de <i>Microcystis</i>.....</u>	40
4.3.1	Crescimento celular.....	40
4.3.2	Produção de clorofila <u>a</u>	44
4.4	<u>Características ecofisiológicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) na presença do meio com exudato de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01).....</u>	45
4.4.1	Crescimento celular	45
4.4.2	Produção de clorofila <u>a</u>	49
4.5	<u>Crescimento de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) e de <i>Monoraphidium</i> (MORF- 01) em condições de cultivo misto.....</u>	51
4.6	<u>Características ecofisiológicas de <i>Microcystis</i> (MIRF-01) e de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01) na presença de meio com exudatos de cultivos mistos.....</u>	57
4.6.1	Crescimento celular.....	57
4.6.2	Produção de clorofila <u>a</u>	63
4.7	<u>Produção de microcistina pela cepa de <i>Microcystis</i> MIRF-01 em diferentes condições cultivo.....</u>	66
4.7.1	Na presença do exudato de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01).....	66
4.7.2	Em cultivo misto com <i>Monoraphidium</i> (MORF-01).....	67
4.7.3	Na presença de exudatos de cultivos mistos.....	68
5	DISCUSSÃO GERAL.....	71
6	CONCLUSÕES.....	76
7	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interações fitoplanctônicas e estratégias de crescimento

Os organismos fitoplanctônicos vivem dispersos flutuando livre e involuntariamente na coluna d'água e constituem os principais produtores primários de ecossistemas aquáticos, como reservatórios, mares e lagos de grande porte. Na coluna d'água, podem coexistir espécies de quase todos os grupos taxonômicos incluindo as clorofíceas e cianobactérias (Reynolds, 1987).

As clorofíceas são microalgas eucariontes fotossintetizantes. São conhecidas como algas verdes devido à predominância de clorofila a e clorofila b, mas também apresentam os pigmentos acessórios como carotenos e xantofilas (Haphey-Hood, 1988).

As cianobactérias constituem um grupo de microrganismos fotossintetizantes procariontes Gram-negativos. Possuem registro fóssil de cerca de 3,5 bilhões de anos atrás e foram os primeiros a realizarem fotossíntese com liberação de oxigênio, tendo um papel importante na criação de condições que favoreceram a proliferação de organismos aeróbios na terra (Charmichael, 1994). Possuem como pigmentos fotossintéticos clorofila a, β -caroteno e pigmentos acessórios como a ficocianina, que é responsável pela sua coloração característica (Paerl, 1988).

Uma das principais características de alguns gêneros e espécies de cianobactérias é a potencial produção de metabólitos secundários tóxicos (Wiegand e Pflugmacher, 2005). Estas cianotoxinas podem ter estruturas químicas distintas e são agrupadas conforme ação farmacológica estudada em animais mamíferos (Carmichael, 1992, 1994) (tabela 1).

Tabela 1: Classificação das cianotoxinas (Carmichael, 1992, 1994).

Cianotoxina	Característica química	Classificação
Microcistinas e nodularinas	Peptídeos cíclicos	Hepatotoxinas
Cilindrospermopsinas	Alcalóide	Hepatotoxinas
Anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas	Alcalóides	Neurotoxinas
Aplysiatoxina, Lyngbiatoxina-a	Alcalóides	Dermatotoxinas

A composição e abundância do fitoplâncton pode ser resultado da competição entre os componentes do habitat que exploram o mesmo nicho. Esses organismos competem principalmente por luz e nutrientes. A competição ainda pode acontecer de forma direta, quando um competidor é afetado por alguma substância química produzida pelo outro.

O conceito de nicho para os organismos fitoplanctônicos é definido principalmente pelas suas características nutricionais. Assim, a absorção de nutrientes, especialmente de fósforo e nitrogênio, tem um papel importante no crescimento fitoplanctônico. Discute-se muito na literatura sobre a influência da razão N/P no crescimento das espécies (Blomqvist *et al.*, 1994). A dominância de cianobactérias tem sido associada com altas concentrações de fósforo total e com baixas concentrações de nitrogênio total e dissolvido (baixa razão N/P). Contudo, autores discutem que a razão N/P é apenas uma consequência da absorção dos nutrientes (Marinho e Azevedo, 2007; Reynolds, 1999). Assim, o que é realmente importante é a disponibilidade dos nutrientes naquele ambiente. Então a espécie que possui maior capacidade de absorção do nutriente disponível terá melhores condições de crescimento. A coexistência de diferentes espécies num ambiente ocorre quando a disputa de recursos disponíveis não inclui aquele que é limitante para o seu crescimento (Begon *et al.* 1995).

Características morfológicas e fisiológicas podem funcionar como estratégias competitivas vantajosas. Os aerótopos (vacúolos gasosos), presentes em alguns gêneros de cianobactérias, assim como os flagelos encontrados em alguns gêneros de clorofíceas,

permitem a exploração vertical da coluna d'água em busca da intensidade luminosa mais adequada e disponibilidade de nutrientes. As células que apresentam alta razão superfície/volume, devido ao tamanho pequeno ou forma diferenciada da esférica como achatada ou filamentosa, também obtêm vantagens, pois são maiores as taxas de absorção de nutrientes e a eficiência fotossintética (Paerl, 1988).

Com base nas características morfológicas e fisiológicas, as diferentes espécies fitoplactônicas foram agrupadas em quatro categorias de estratégias de crescimento e sobrevivência (Reynolds, 2006).

O grupo dos C-estrategistas é composto pelos organismos invasores oportunistas. Compreendem os organismos pequenos, geralmente unicelulares e que apresentam altas taxas de crescimento em ambientes repletos de recursos (alta intensidade luminosa e disponibilidade de nutrientes). Entretanto, não sustentam altas taxas de crescimento por longos períodos. Alguns possuem mobilidade e por isso as taxas de sedimentação são baixas. São vulneráveis à predação devido ao tamanho. Estão incluídos neste grupo os gêneros *Chorella*, *Ankyra*, *Chlamydomonas*, *Monoraphidium*, entre outros.

Os organismos que toleram ambientes com baixa disponibilidade de recursos estão agrupados nos S-estrategistas. Estes exploram fontes alternativas como fixação de nitrogênio e produção de fosfatase. Alguns são unicelulares grandes, mas a maioria é colonial. Como apresentam tamanhos maiores, conseqüentemente as taxas de crescimento são menores. A eficiência fotossintética também é menor em função do tamanho grande acompanhado de formas não atenuadas. Podem controlar migração vertical na coluna d'água, o que é uma vantagem adaptativa. Entre os gêneros representativos estão *Microcystis*, *Anabaena*, *Gloeotrichia* e *Uroglena*.

O grupo dos R-estrategistas reúne organismos capazes de crescer com baixas intensidades luminosas ou com variações de altas intensidades luminosas. Isto é possível

devido ao tamanho pequeno ou forma plana, o que propicia alta afinidade por fótons. Alguns são unicelulares, mas a maioria é filamentososa. Encontram-se em habitats onde as condições podem ser transitórias. Alguns gêneros que pertencem a este grupo são *Planktothrix*, *Limnothrix*, *Asterionella* e *Aulacoseira*.

Os organismos que toleram o estresse crônico, como a baixa disponibilidade de nutrientes, que ocorre em regiões oceânicas e lagos ultraoligotróficos, foram reunidos no grupo dos SS-estrategistas. São representados por espécies de picoplâncton procarionte, tais como o gênero *Prochlorococcus* encontrado no mar e os gêneros *Cyanobium* e *Cyanodiction* em lagos.

Dessa forma, cada tipo de estratégia reflete a história evolutiva, incluindo adaptações que permitem a sobrevivência destes organismos em determinadas condições ambientais. Além disso, a interação com organismos competidores e predadores também influencia o crescimento de uma espécie em detrimento de outra, que poderá dominar o ambiente ou apenas coexistir com outros organismos.

1.2 Fatores que influenciam a dominância de cianobactérias

A crescente dominância das cianobactérias nos corpos d'água tem forte impacto sobre o meio ambiente e pode causar mortandade de animais aquáticos, devido à presença de cianotoxinas e à redução de oxigênio dissolvido na água por causa da massa de células geradas. Como estas são consideradas endotoxinas (Paerl, 1988), representam maior perigo para o ecossistema aquático durante a lise celular, especialmente ao final de uma floração (intenso crescimento de células no corpo d'água) quando são liberadas em altas concentrações (Christoffersen, 1996).

O crescimento intensificado de cianobactérias tóxicas também compromete a qualidade da água, aumentando o custo do seu tratamento. Além disso, essa dominância pode

representar um risco à saúde pública, uma vez que pode ocorrer intoxicação pelo contato com essa água contaminada, pelo consumo de peixes e pela contaminação de reservatórios de abastecimento público (Codd *et al.*, 2005; Duy *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005).

A ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias em diversos corpos d'água de diferentes regiões brasileiras vem se tornando freqüente (Sant'Anna e Azevedo, 2000), devido ao crescente processo de eutrofização. Este processo deve-se principalmente à descarga de esgoto doméstico e industrial dos centros urbanos e ao escoamento de fertilizantes de áreas agrícolas para os corpos d'água. Com isso, ocorre um enriquecimento de nutrientes no ecossistema aquático, alterando a estrutura da comunidade fitoplanctônica.

Como exemplo, temos o Reservatório do Funil, situado em Resende (RJ), onde já foi observada uma alteração na composição do fitoplâncton associada ao processo de eutrofização ocorrido nas últimas décadas. Estudos realizados em 1978 indicaram a dominância de clorofíceas no reservatório (FEEMA, 1992). No entanto, dados de 1989 registraram uma expressiva dominância de cianobactérias (FEEMA, 1992), ressaltada também em trabalhos mais recentes (Rocha, 2007; Soares, 2008). Soares (2008) mostrou que durante o período de junho de 2002 a junho de 2003, a comunidade fitoplanctônica era composta em sua maioria por algas verdes e cianobactérias, e foram identificados 34 e 21 táxons, respectivamente. Entretanto, a biomassa fitoplanctônica era composta em mais de 90% pelo grupo de cianobactérias, com dominância de três espécies principais: *Anabaena circinalis*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*.

O sucesso das cianobactérias em diferentes condições ambientais deve-se à diversidade fisiológica e morfológica, o que permite uma plasticidade adaptativa (Paerl, 1988). Dentre as características que favorecem o crescimento em ambientes de água doce está a adaptação a diferentes intensidades luminosas devido à variedade de pigmentos cromáticos que possuem. Gêneros formadores de florações como *Microcystis*, podem tolerar altas intensidades,

enquanto representantes de outros gêneros, como *Cylindrospermopsis*, podem habitar em maiores profundidades, onde a intensidade luminosa é menor. Uma outra característica importante é a presença de aerótopos, encontrados em alguns gêneros como *Microcystis*, que permitem a migração vertical na coluna d'água. Além disso, podem ser citadas a capacidade de formação de colônias, que pode minimizar a herbivoria; a fixação de N₂ atmosférico por espécies filamentosas, que permite crescer em ambientes com deficiência de nitrogênio; e a capacidade de estocar fósforo. (Paerl, 1988; Reynolds, 1987).

Além do incremento de nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) e das particularidades favoráveis das células, a dominância em ambientes de água doce tem sido associada com estabilidade da coluna d'água, baixa razão N/P, baixa intensidade luminosa, alta temperatura, baixos teores de CO₂ dissolvido na água e pH básico, (Blomqvist *et al.*, 1994; Shapiro, 1990; Smith, 1986; Watson *et al.*, 1997).

Recentemente, estudos vêm apontando que além dos fatores ambientais, fatores biológicos tais como a composição fitoplanctônica e os seus produtos excretados também poderiam influenciar o crescimento das cianobactérias e a produção de toxinas (Kearns e Hunter, 2000; Vardi *et al.*, 2002).

Dessa forma, a dominância e formação de floração por uma determinada espécie depende de suas características individuais, condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e da interação com os organismos competidores e predadores existentes naquele ecossistema aquático. Contudo, qualquer alteração nas condições estabelecidas para o seu sucesso, como por exemplo a ocorrência de mistura na coluna d'água, pode levar a perda da dominância (Pearl, 1988).

1.3 Comunicação celular por meio de infoquímicos

A comunicação através de substâncias químicas ocorre entre diversos organismos no ambiente aquático. Um dos modelos mais estudados é a interação entre presa e predador (Brönmark e Hanson, 2000). Todavia, a comunicação química entre os organismos ocorre tanto no nível inter-específico como intra-específico.

Esta comunicação ocorre através de substâncias químicas, conhecidas como infoquímicos, que representam uma fonte de informação sobre o meio biótico e abiótico ao seu redor. Os infoquímicos não apresentam características estruturais em comum (muitas vezes sua estrutura ainda não foi identificada), ocorrem em concentrações muito baixas (na faixa de nano a micromolar) e são capazes de induzir alterações comportamentais, morfológicas ou fisiológicas (Klaschka, 2008). A atividade dos infoquímicos geralmente é espécie-específica (Babica *et al.*, 2007), ou seja, um composto pode ter um efeito numa espécie e não apresentar efeito em outra espécie, ou até induzir uma resposta diferente.

Em bactérias, a comunicação entre células ocorre por *quorum sensing*. Neste mecanismo, que é dependente da densidade celular, moléculas sinalizadoras (auto-indutores) são utilizadas para coordenar respostas às condições ambientais (Waters e Bassler, 2005). *Quorum sensing* regula processos como competência genética, bioluminescência, virulência, esporulação e entrada na fase estacionária devido à exaustão de nutrientes (Lazazzera, 2000). Este mecanismo é pouco conhecido em cianobactérias, contudo, indutores já foram identificados em cepas dos gêneros *Anabaena* (Romero *et al.*, 2008) e *Gloeothece* (Sharif *et al.*, 2008). Isto indica que este tipo de comunicação pode ocorrer também em cianobactéria. Um estudo com uma cepa de *Microcystis*, mostrou que o meio com exudato de culturas antigas e cloróticas (cor pálida) inibiu o seu crescimento e também alterou a pigmentação celular (Dagnino *et al.*, 2006). Isto sugere a existência de um mecanismo de controle da densidade celular.

O gênero *Microcystis* é capaz de produzir, além das toxinas conhecidas, uma variedade de peptídeos com atividade biológica especial que não participam do seu metabolismo primário (Welker *et al.*, 2006). Isso demonstra a potencialidade desse gênero, responsável por florações em todo o mundo, para produzir diversos compostos bioativos.

A liberação de uma substância química que inibe o crescimento do competidor pode ser considerada uma vantagem adaptativa para o organismo produtor, como ocorre em interações alelopáticas. Os principais efeitos provocados por estes compostos alelopáticos são a inibição do crescimento e da fotossíntese (Figueiredo *et al.*, 2007; Legrand *et al.*, 2003; Smith e Doan, 1999). Foi verificado que de um total de 182 combinações entre diferentes cepas de cianobactérias e clorofíceas isoladas de ambientes de água doce da Flórida (EUA), 37 destes cultivos mistos mostraram interações com efeitos inibitórios ou estimulantes do crescimento (Gantar *et al.*, 2008).

Após longo tempo de coexistência no mesmo ambiente, os organismos podem se adaptar e apresentar resistência, e dessa forma as interações alelopáticas seriam transitórias (Reigosa *et al.*, 1999). Mohamed (2008) mostrou que duas espécies de clorofíceas que coexistem com *Microcystis* e microcistinas apresentam um aumento no conteúdo de polissacarídeos associado ao estresse oxidativo induzido pela microcistina. Isto sugere a existência de uma resposta adaptativa protetora frente ao competidor. Por outro lado, interações alelopáticas entre espécies que coexistem no mesmo ambiente também já foram observadas (Kearns e Hunter, 2000, 2001; Keating, 1978; Vardi *et al.*, 2002). Assim, no ambiente algumas espécies podem estar adaptadas e outras sensíveis aos compostos alelopáticos produzidos pelos competidores (Legrand *et al.*, 2003).

Os efeitos alelopáticos podem ocorrer com indução de estresse físico, como limitação de luminosidade (von Elert e Jüttner, 1996), químico, como escassez de nutrientes (von Elert e Jüttner, 1996) ou biológico, como a presença do competidor (Soares, 2008). Além disso,

Suikkanen *et al.* (2004) demonstraram que a produção de compostos alelopáticos pode variar em função da fase de crescimento, uma vez que *Nodularia spumigena* produziu mais substâncias com atividade alelopática em fase exponencial do que na estacionária.

Dentre os vários metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e outras algas, alguns apresentam atividade alelopática, inclusive as cianotoxinas (Leflaive e Tem-Hage, 2007; Legrand *et al.*, 2003). Alguns compostos podem ter participação na regulação de populações naturais, como observado em casos de sucessões de espécies num ambiente (Keating, 1978; Vardi *et al.*, 2002) e ainda funcionar como importantes ferramentas bioquímicas (Jaiswal *et al.*, 2008; Vardi *et al.*, 2002).

Como nenhuma função específica foi atribuída às cianotoxinas, muitos estudos são realizados, principalmente com microcistina, para entender o papel fisiológico e ecológico desses compostos. Grande parte desses estudos tem investigado os efeitos de microcistina em organismos fitoplantônicos e demonstrado que podem ocorrer alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas (Babica *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2004; Sedmak e Elersek, 2006; Sedmak e Kosi, 1998). Além disso, um outro aspecto importante é investigar a influência que organismos podem ter sobre a produção de cianotoxinas.

Embora na maioria dos casos a estrutura não tenha sido identificada, estudos com os produtos excretados sugerem a presença de infoquímicos. Kearns e Hunter (2000) mostraram que produtos excretados pela clorofícea *Chlamydomonas reinhartii* alteram a concentração das duas toxinas produzidas pela cianobactéria *Anabaena flos-aquae*. Os produtos excretados por *A. flos-aquae* inibiram o crescimento da clorofícea, o que ocorreu também em cultivo misto. Testes com as toxinas purificadas indicaram que esta inibição pode ser causada por microcistina. Em outro trabalho (Oliveira, 1997) foi verificado que em cultivos mistos da cianobactéria *Synechocystis aquatilis* com a clorofícea *Monoraphidium convolutum*, quanto maior o percentual da clorofícea, maior foi a concentração de microcistina produzida pela

cianobactéria. Entretanto, o crescimento da clorofícea foi inibido por metabólitos excretados por *S. aquatilis* (Oliveira, 1997).

Alguns autores não consideram as toxinas intracelulares como infoquímicos, uma vez que estes devem ser substâncias extracelulares (Babica *et al.*, 2007; Klaschka, 2008). No entanto, determinados estudos têm demonstrado que algumas possuem função alelopática. (Leflaive e Tem-Hage, 2007; Legrand *et al.*, 2003). Um outro trabalho (Kearns e Hunter, 2001) mostrou que anatoxina e microcistina produzidas por *A. flos-aquae* induzem a paralisação da clorofícea móvel *Chlamydomonas reinhardtii*. Os autores sugerem que a produção de toxina é uma adaptação que permite à cianobactéria reduzir os efeitos da competição, em ambientes com recursos limitados, com outros organismos fitoplanctônicos.

1.4 Fatores que influenciam a produção de microcistinas

As microcistinas são hepatotoxinas produzidas por alguns gêneros de cianobactérias incluindo *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Radiocystis*, *Phormidium* e *Synechocystis* (Metcalf *et al.*, 2006).

Estruturalmente são heptapeptídeos cíclicos (figura 1), caracterizados pela presença de 5 aminoácidos fixos (D-aminoácidos) e 2 variáveis (L-aminoácidos). As microcistinas apresentam mais de 70 variantes e a mais comumente encontrada é a microcistina-LR (Spoof *et al.*, 2003). Possuem como mecanismo de ação em células eucariontes a inibição de proteínas fosfatases tipo 1 e 2A, que são responsáveis pelos processos de fosforilação de outras proteínas dentro das células, tendo também um papel importante na divisão celular (Carmichael, 1992; Dawson, 1998).

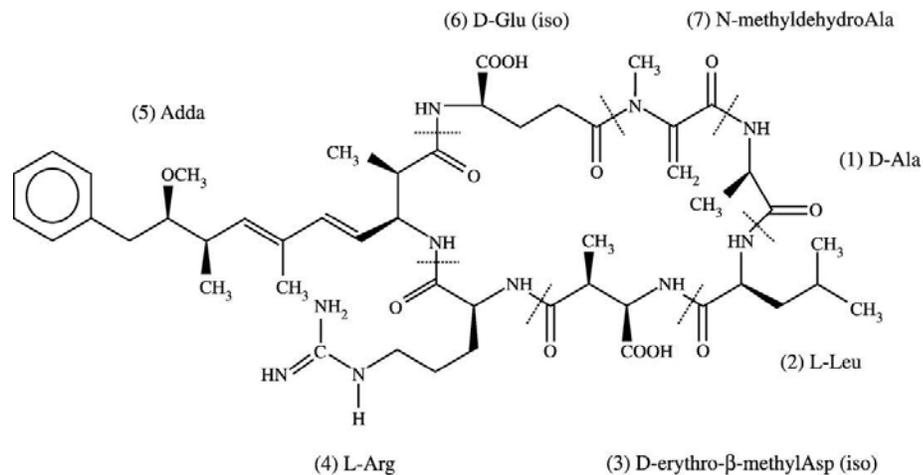


Figura 1 - Estrutura química da microcistina-LR. Os números indicam os sete aminoácidos que compõem a molécula (Wiegand e Pflugmacher, 2005)

A síntese de microcistinas é não ribossomal, e envolve um grande complexo enzimático que inclui peptídeo sintetases, policetídeo sintases e enzimas modificadoras adicionais (Jaiswal *et al.*, 2008; Tillett *et al.*, 2001). A expressão e regulação desses genes são realizadas por mecanismos complexos que são influenciados por fatores ambientais tais como intensidade luminosa, temperatura, pH, nutrientes e metais traço como o ferro (Jaiswal *et al.*, 2008; Kaebernick e Neilan, 2001; Song *et al.*, 2006). Estudos genéticos (Kaebernick *et al.*, 2000) mostraram que a intensidade e qualidade da luz podem regular os genes envolvidos na produção de microcistina. Oh *et al.* (2000) observaram que o acréscimo de fósforo no meio de cultura estimulou a produção de toxina em *M. aeruginosa*. Alta produção de microcistinas também pode estar relacionada às fases de crescimento celular (Kaebernick e Neilan, 2001; Kearns e Hunter, 2001; Watanabe *et al.*, 1989; Watanabe e Oishi, 1985).

Além desses fatores, já foi demonstrado que a produção de toxina pode ser influenciada por outros organismos como predadores (Jang *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2008) e competidores, como observado no caso da clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii*, cujos produtos excretados

podem aumentar a produção de anotoxina e reduzir a de microcistina (Kearns e Hunter, 2000). Outra situação demonstrou que o meio de cultivo com exudato de dinoflagelado induziu um aumento na síntese de microcistina (Vardi *et al.*, 2002). Dessa forma, a produção de microcistinas pode ser afetada positiva ou negativamente pela presença de outros organismos. Embora mais estudos sejam necessários para entender o papel ecológico da microcistina nessas interações, estes estudos mostram que a regulação da síntese de toxinas é reflexo de vários fatores que atuam sinergicamente colaborando para toxicidade de uma cepa de cianobactéria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Investigar a interação entre cepas de cianobactéria e uma cepa de clorofíceas em condições de cultivo, buscando ampliar o conhecimento sobre as condições que determinam o sucesso de uma dada espécie em detrimento de outra no ambiente.

2.2 Objetivos específicos

- Testar o efeito da matéria orgânica excretada por diferentes cepas de cianobactéria do gênero *Microcystis* sobre uma cepa da clorofíceas *Monoraphidium contortum*, avaliando alterações no crescimento e concentração de clorofila a.
- Testar o efeito da matéria orgânica excreta por *M. contortum* sobre uma cepa de *Microcystis* cf. *aeruginosa* tóxica, isolada do mesmo ambiente, avaliando alterações no crescimento e concentração de clorofila a e produção de microcistinas.
- Testar o efeito da matéria orgânica excreta por *M. contortum* sobre uma cepa de *M. aeruginosa* não tóxica, isolada de outro ambiente, avaliando alterações no crescimento e concentração de clorofila a.
- Testar o efeito do cultivo misto de *M. contortum* e *M. cf. aeruginosa* tóxica ou *M. aeruginosa* não tóxica avaliando alterações no crescimento da cianobactéria e da clorofíceas e produção de microcistinas pela cianobactéria.
- Testar o efeito da matéria orgânica excreta por cultivos mistos de *M. contortum* e *M. cf. aeruginosa* tóxica sobre *M. contortum* e *M. cf. aeruginosa* tóxica, avaliando alterações no crescimento, na concentração de clorofila a e produção de microcistinas.

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas utilizadas

Neste estudo foram utilizadas três cepas tóxicas de cianobactéria (produtoras de microcistinas) da espécie *Microcystis aeruginosa* (MILJ-04), *Microcystis* cf. *aeruginosa* (MIRF-01, MILJ-48), uma cepa de *Microcystis aeruginosa* não tóxica (MICD-01) e uma cepa de clorofícea da espécie *Monoraphidium contortum* (MORF-01). As cepas MIRF-01 e MORF-01 foram isoladas do reservatório do Funil, localizado no município de Resende, RJ. A cepa MICD-01 foi isolada de um reservatório de água do bairro de Cidade de Deus, RJ. As cepas MILJ-04, MILJ-48 foram isoladas da Lagoa de Jacarepaguá, RJ.

A cepa da espécie de *Monoraphidium* (MORF-01) utilizada é mostrada na figura 2. As cepas de *Microcystis* utilizadas nesse trabalho possuem tamanhos distintos de 7,5 e 4,0 μm de diâmetro (os resultados correspondem à média de 90 células) são mostradas nas figuras 3 (MIRF-01) e 4 (MICD-01), respectivamente. As imagens foram obtidas por microscopia ótica (Olympus BX-50), com um aumento de 100 vezes.



Figura 2: Cepa de *Monoraphidium contortum* (MORF-01)



Figura 3: Cepa tóxica de *Microcystis cf. aeruginosa* (MIRF-01)

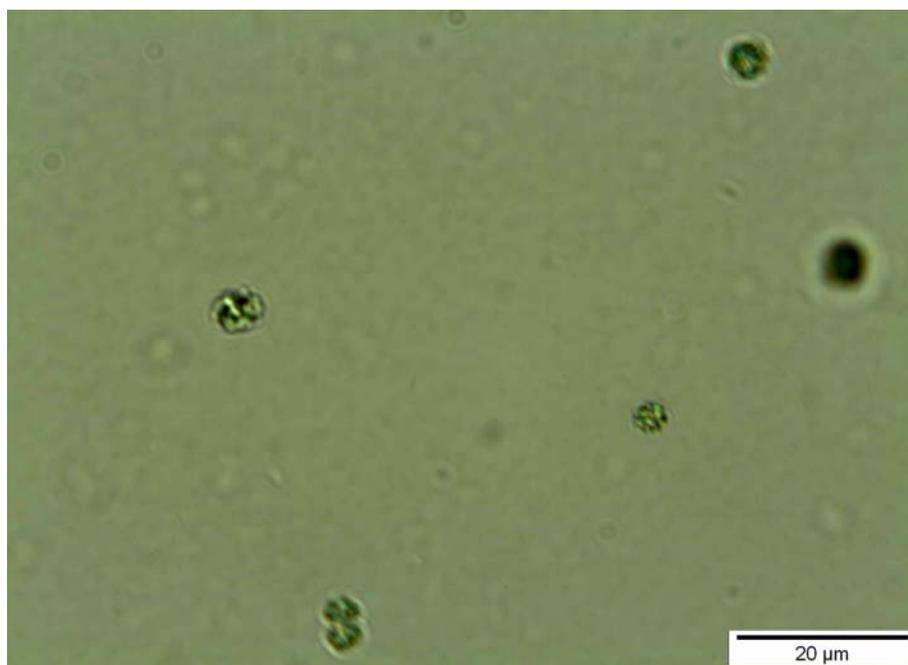


Figura 4: Cepa não-tóxica de *Microcystis aeruginosa* (MICD-01)

3.2 Condições de cultivo de células

As cepas foram mantidas em meio de cultura ASM-1 com pH ajustado para 8,0 (Gorham *et al.*,1964), temperatura ambiente de 24±2°C e fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro. As culturas utilizadas eram não axênicas. Para manutenção das culturas de clorófitas foi adicionada ao meio uma solução (1mL/L) contendo as vitaminas tiamina (0,1mg/L), biotina (0,5µg/L) e B12 (0,5µg/L).

Em condições experimentais, os cultivos foram realizados com aeração constante e sob intensidade luminosa de 140 µE.m⁻².s⁻¹.

3.3 Contagem de células

O crescimento celular foi acompanhado por meio de contagem de células realizada em microscópio ótico, utilizando uma câmara de Fuchs-Rosenthal. A cepa MIRF-01 foi submetida a um tratamento para romper as colônias. Esse tratamento consiste na adição de NaOH 1M na proporção de 2:1 (amostra:solução) e aquecimento em banho maria a 60°C por 10 minutos. Com esse tratamento as células da cepa MIRF-01 foram separadas da mucilagem, permitindo assim a contagem individual das células. No caso dos cultivos mistos, as células das cepas MIRF-01 e a cepa MORF-01 foram contadas em câmaras separadas, pois devido ao tratamento para romper as colônias da cepa MIRF-01, as células da clorófitas passaram a ficar aglutinadas.

As taxas de crescimento (μ) foram determinadas conforme a fórmula descrita em Fogg e Thake (1987) apresentada abaixo:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1)/(t_2-t_1)$$

Onde:

μ = taxa de crescimento

N_1 e N_2 = número de células/mL nos tempos t_1 e t_2

Também foi determinado o rendimento máximo das culturas (R), que corresponde ao número máximo de células atingido ao final do cultivo subtraído do número de células no inóculo inicial.

3.4 Determinação da concentração de clorofila *a*

A concentração de clorofila *a* foi determinada, após filtração de um volume conhecido das amostras em filtro de borossilicato (13mm). Posteriormente, foi adicionado a este filtro um volume determinado de acetona 90%. Esta suspensão foi agitada em Vortex e incubada por 20 horas no escuro, a 4°C. Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 1600g por 15 min (Eppendorf - modelo 5403) e 3mL do sobrenadante foram utilizados para determinar a concentração de clorofila *a* por espectrofotometria (Shimadzu - UV mini 1240). A leitura foi feita a 664 e a 750nm, para correção da turbidez. Em seguida, a amostra foi acidificada com 0,1mL de HCl 0,1N para descontar a concentração de feofitina *a*, levemente agitada, e após 90s a leitura foi realizada a 665 e a 750nm. Os cálculos para obtenção da concentração de clorofila *a* estão descritos no manual para métodos padrão (APHA, 1995).

3.5 Determinação da concentração de microcistinas

Um volume conhecido de cultivo foi retirado em cada condição experimental e passado em filtro de borossilicato (47mm). Os filtros foram utilizados para analisar o conteúdo de toxina intracelular. Os filtrados foram utilizados para determinar a concentração de microcistinas na porção dissolvida.

A extração de microcistinas intracelulares foi realizada a partir do material retido nos filtros. Estes foram picotados para facilitar a extração, e em seguida foi adicionado metanol:ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (Barco *et al.*, 2005) até cobri-los por inteiro. Após 1 hora em agitação constante, o extrato foi centrifugado a 3000g por 15 min. O processo foi

repetido por mais duas vezes com o precipitado. Os sobrenadantes foram recolhidos ao final de cada centrifugação e reunidos para evaporação total sob fluxo de ar comprimido. Esse material foi ressuspensão em 20mL de água MILLI-Q e passado em cartucho com 2g da resina HP-20 (Supelco) para concentrar e purificar o extrato.

No caso dos filtrados, utilizados para determinar a concentração de microcistinas na porção dissolvida, esses foram passados diretamente no cartucho.

Os cartuchos foram previamente ativados com a passagem de 20mL de metanol 100%, seguido de 20mL de água MILLI-Q. Após a passagem da amostra, foi feita a lavagem com 10mL metanol 10%, 10mL metanol 20% e 10mL metanol 30%, respectivamente. Todas estas frações foram descartadas e o material retido no cartucho foi eluído com 20mL de metanol:TFA 0,1%. Esta fração foi evaporada totalmente sob fluxo de ar comprimido e ressuspensa em 2mL de metanol:TFA 0,1%.

Após 1 hora em agitação constante para solubilização, essa amostra foi filtrada em filtros de celulose regenerada (0,45 μ m, 13mm). Na condição experimental 3.7.7 foram utilizados cartuchos de 1g de ODS (Bakerbond - 7466-07 - Octadecyl - Polar Plus). A pré-ativação desses cartuchos e o procedimento para concentrar e purificar cada extrato foi realizado da mesma forma que para o cartucho de resina HP-20.

As análises para determinar a concentração de microcistinas foram realizadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O sistema de HPLC e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Descrição dos componentes do sistema HPLC utilizado (Shimadzu)

Componentes	Descrição
Detector	U.V./Vis - Detector de diodo - SPDM10Avp
Bomba	LC-10AT VP
Loop	100 μ L
Coluna	C ₁₈ , Lichrospher 100 RP (fase reversa) - 18, 125 x 4mm, 5 μ m
Aplicativo	LZ Workstation Class - vp

Tabela 3 – Descrição das condições de cromatografia analítica utilizada

Parâmetros	Condição
Fluxo	1mL/min
Volume injetado	100 μ L
U.V.	Espectro de absorção de 195 a 300nm
Fase móvel	Condição isocrática; 72% de acetato de amônia 20mM, pH 5,0 e 28% de acetonitrila (grau HPLC)
Deteção	238nm
Tempo	15 min

O espectro de absorção de cada pico obtido nos cromatogramas foi analisado e comparado com o espectro obtido a partir de uma solução padrão de microcistina-LR. Para calcular as concentrações foram utilizadas as áreas dos picos com similaridade igual ou

superior a 99% do padrão. A quantificação foi feita com base numa curva, previamente estabelecida, com concentrações variáveis da microcistina padrão nas mesmas condições da cromatografia analítica utilizada.

3.6 Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico das taxas de crescimento, do rendimento celular, da concentração de clorofila *a* e de microcistinas nas diferentes condições de cultivo, exceto para a condição experimental 3.7.6, foi realizado através do Teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA), seguido pelo Teste de *Dunn* para comparação entre a condição controle e cada tratamento. As taxas de crescimento, o rendimento celular e a concentração de microcistinas na condição experimental 3.7.6 foram analisados através da comparação entre a condição monoespecífica e a condição de cultivo misto através do Teste U de *Mann-Whitney*. Para ambos os testes o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad InStat, versão 3.06.

3.7 Experimentos de interação entre *Monoraphidium* e *Microcystis*

3.7.1 Avaliação de características ecofisiológicas de *Microcystis* (MIRF-01 e MICD-01) e de *Monoraphidium* (MORF-01) em condições monoespecíficas

Inicialmente foram realizados cultivos monoespecíficos (em triplicata) de cada cepa por 16 dias, nas condições de cultivo descritas no item 3.2. A partir de contagem de células/mL a cada dois dias, foram estabelecidas as curvas de crescimento das cepas MIRF-01, MORF-01 e MICD-01. A cada quatro dias foram retiradas amostras para determinação da concentração de clorofila *a* e microcistinas intracelulares e dissolvidas (culturas da cepa MIRF-01), como descrito nos itens 3.4 e 3.5, respectivamente.

3.7.2 Obtenção do meio com matéria orgânica excretada (exudato)

Um volume apropriado de cada cultura foi centrifugado (Sorvall – RC5B) para separar o excesso de células, em seguida o meio foi filtrado utilizando filtro de borossilicato. Neste meio de cultivo contendo os exudatos foram adicionados nutrientes em concentrações equivalentes aquelas do mesmo volume de meio ASM-1. A seguir, o exudato foi esterilizado por filtração, utilizando filtro de poro 0,22µm (Millipore - GV-PVDF - 47mm), em aparato de filtração estéril ou utilizando um sistema de filtração estéril com de poro de 0,22µm (TTP – 85x85x213mm – reservatório de 500mL), no caso de volumes maiores. Desses exudatos foi retirada uma alíquota para determinar o valor do pH e avaliar se estava próximo ao valor do meio de cultivo (8,0), mas os valores não foram corrigidos. Posteriormente, cada exudato foi distribuído nas devidas proporções em meio ASM-1.

3.7.3 Avaliação de características ecofisiológicas de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença do meio com exudato de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01)

Para investigar a influência dos produtos excretados pelas cepas de *Microcystis* MIRF-01 ou MICD-01 sobre a cepa de *Monoraphidium* MORF-01, foram utilizados como parâmetros o número de células/mL e a concentração de clorofila a da clorofíceia. Os exudatos de *Microcystis* MIRF-01 e MICD-01 foram obtidos a partir da matéria orgânica excretada no meio de cultivo (550mL) de culturas em fase de crescimento correspondente ao final da fase exponencial com 9 e 11 dias, respectivamente para cada cepa, como descrito no item 3.7.2. Cada exudato foi distribuído nas proporções de 5, 10 ou 50% em meio ASM-1 para um volume final de 150mL em *Erlenmeyer* ou balões de 250mL (5 réplicas para cada condição). O inóculo da cepa MORF-01 foi de aproximadamente $5,5 \times 10^5$ células/mL. O tempo experimental foi de 12 dias, baseado na curva de crescimento. As condições de cultivo estão descritas no item 3.2. As amostragens foram feitas nos dias 0, 3, 6 e 12 de cultivo para contagem de células/mL e 0, 6 e 12 para determinação da concentração de clorofila a.

3.7.4 Avaliação de características ecofisiológicas de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença do meio com exudato de diferentes cepas tóxicas de *Microcystis* (MIRF-01, MILJ-04 ou MILJ-48)

A fim de investigar a especificidade da resposta da cepa de *Monoraphidium* MORF-01 aos produtos excretados por cianobactérias, foram utilizadas outras duas cepas tóxicas (produtoras de microcistina) de *Microcystis* do banco de cultura do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, MILJ-04 e MILJ-48. Nesse experimento foram utilizados como parâmetros o número de células e a concentração de clorofila a da clorofícea. Os exudatos foram obtidos a partir da matéria orgânica excretada no meio de cultivo (350mL) de culturas de *Microcystis* (MIRF-01, MILJ-04 e MILJ-48) em fase de crescimento correspondente ao final da fase exponencial com 9 dias, como descrito no item 3.7.2. Cada meio com exudato foi distribuído na concentração de 50% em ASM-1 para um volume final de 150mL em balões de 250mL. O experimento foi realizado com 4 réplicas para cada condição. O inóculo da cepa MORF-01 foi de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL. O tempo experimental foi de 3 dias. Nesse caso foi decidido reduzir o tempo experimental, uma vez que dados da literatura mostram que o efeito causado pela adição de um exudato geralmente é observado no início do cultivo. As condições de cultivo utilizadas estão descritas no item 3.2, entretanto os cultivos não foram aerados. As amostragens foram realizadas somente no último dia de cultivo para contagem de célula/mL e determinação da concentração de clorofila a.

3.7.5 Avaliação de características ecofisiológicas de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01) na presença do meio com exudato de *Monoraphidium* (MORF-01)

Para investigar a influência dos produtos excretados pela cepa de *Monoraphidium* MORF-01 sobre as cepas de *Microcystis* MIRF-01 ou MICD-01 foram utilizados como parâmetros o número de células/mL, a variação da concentração de clorofila a e de microcistinas intracelulares. O exudato da cepa MORF-01 foi obtido a partir da matéria

orgânica excretada no meio de cultivo (3,5L) de uma cultura em fase de crescimento correspondente ao final da fase exponencial com 11 dias, como descrito no item 3.7.2. Esse meio com exudato foi distribuído nas proporções de 5, 10 ou 50% em ASM-1 para um volume final de 150mL em balões de 250mL (MICD-01) ou 1000mL em balões 3L (MIRF-01). O experimento foi realizado com 4 réplicas para cada condição. O inóculo da cepa MIRF-01 e da cepa MICD-01 foi de aproximadamente $5,5 \times 10^5$ células/mL. O tempo experimental também foi de 12 dias, baseado na curva de crescimento, como no experimento descrito no item 3.7.3. As condições de cultivo estão descritas no item 3.2. As amostragens foram feitas nos dias 0, 3, 6 e 12 de cultivo para contagem de células/mL e 0, 6 e 12 para determinação da concentração de clorofila *a*. A amostragem para determinação da concentração de microcistinas intracelulares foi realizada somente no último dia de cultivo (entre o final da fase exponencial e o início da estacionária).

3.7.6 Avaliação do crescimento das cepas de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01) e da cepa de *Monoraphidium* (MORF-01) em condições de cultivo misto

Neste experimento foi avaliada a influência do contato direto entre *Monoraphidium* e *Microcystis* sobre o número de células/mL e a concentração intracelular de microcistinas. Para isso foram preparados 3 cultivos mistos na proporção de 1:1 entre *Monoraphidium* MORF-01 e *Microcystis* tóxica MIRF-01 e outros 3 entre *Monoraphidium* MORF-01 e *Microcystis* não tóxica MICD-01. Também foram feitos cultivos monoespecíficos de cada cepa em triplicata para comparar com os cultivos mistos. Os inóculos foram de aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/mL em balões de 3L. O tempo experimental teve como objetivo acompanhar o cultivo somente até 6º dia da fase exponencial. As condições de cultivo utilizadas estão descritas no item 3.2. As amostragens foram realizadas nos dias 0, 3 e 6 para contagem de células/mL, e para determinação da concentração de microcistinas somente no último dia de crescimento (6).

3.7.7 Avaliação de características ecofisiológicas de *Microcystis* (MIRF-01) e de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença do meio com exudatos de cultivos mistos

A presença do competidor pode induzir a produção de compostos diferentes daqueles produzidos por um organismo crescendo em ambiente onde não há disputa por recursos. Dessa forma, foram utilizados meios com exudatos de cultivos mistos para verificar se existe diferença de resposta quanto ao número de células/mL e à concentração de clorofila a em comparação ao efeito do exudato de culturas mono específicas. Para isso, foram feitos cultivos mistos entre MIRF-01 e MORF-01, em três proporções diferentes: inóculo inicial de 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (cultivo A), inóculo inicial de 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (cultivo B), e inóculo inicial de 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (cultivo C). Cada cultivo continha um total de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Após período de seis dias de interação entre as duas espécies em cultivo misto, o exudato foi obtido a partir de um volume de 500ml de cada cultivo, como descrito no item 3.7.2. Cada meio com exudato foi distribuído nas proporções de 50 e 100% em ASM-1 para um volume final de 100mL, em *Erlenmeyer* ou balões de 250mL (3 réplicas para cada condição). O inóculo da cepa MORF-01 foi de aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/mL. O tempo experimental teve como objetivo acompanhar o cultivo somente até 6º dia da fase exponencial. As condições de cultivo estão descritas no item 3.2. As amostragens para contagem de células/mL e determinação da concentração de clorofila a foram feitas nos dias 0, 2, 4 e 6 de cultivo.

Os mesmos tipos de cultivos (A, B e C) também foram utilizados para avaliar a resposta da cepa MIRF-01 em relação ao número de células/mL, concentração de clorofila a e microcistinas intracelulares. Cada meio com exudato foi distribuído na proporção de 50% em ASM-1 para um volume final de 400mL em *Erlenmeyer* de 1L (3 réplicas para cada condição). O inóculo de MIRF-01 foi de aproximadamente $5,5 \times 10^5$ células/mL. O tempo experimental teve como objetivo acompanhar o cultivo até 6º dia da fase exponencial. No

entanto, o experimento foi estendido até o 12º dia para avaliar a produção de microcistinas. As condições de cultivo estão descritas no item 3.2. As amostragens foram feitas nos dias 0, 2, 4, 6 e 12 para contagem de células/mL e determinação da concentração de clorofila *a*. As amostragens para determinação da concentração de microcistinas intracelulares foram realizadas em duas fases de crescimento diferentes, que corresponderam ao 4º (fase exponencial) e 12º (entre o final da exponencial e início estacionária) dia de cultivo.

Tabela 4 – Resumo das condições dos experimentos de interação entre *Monoraphidium* e *Microcystis*

Experimentos	Tempo experimental	Concentrações	Idade do exudato
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01)	12 dias	5, 10 ou 50% dos exudatos	9 dias (MIRF-01) 11 dias (MICD-01)
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de <i>Microcystis</i> (MIRF-01, MILJ-04 ou MILJ-48)	3 dias	50% dos exudatos	9 dias
<i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) + exudato de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01)	12 dias	5, 10 ou 50% dos exudatos	11 dias
Cultivo misto de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) + <i>Monoraphidium</i> (MORF-01)	6 dias	50% <i>Microcystis</i> + 50% <i>Monoraphidium</i>	-
<i>Microcystis</i> (MIRF-01) + exudato de cultivos mistos	6 dias	50 ou 100% dos exudatos	6 dias
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de cultivos mistos	6 dias	50% dos exudatos	6 dias

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 Características ecofisiológicas das cepas de *Microcystis* (MIRF-01 e MICD-01) e da cepa de *Monoraphidium* (MORF-01) em condições monoespecíficas

4.1.1 Crescimento celular

As curvas de crescimento das cepas de *Microcystis* (MIRF-01 e MICD-01) e da cepa de *Monoraphidium* (MORF-01) são mostradas nas figuras 5 e 6, respectivamente.

A partir das curvas de crescimento obtidas, foram calculados a taxa de crescimento e o rendimento celular. Como pode ser observado na figura 7a, a cepa de *Microcystis* MIRF-01 apresenta uma taxa de crescimento (μ) menor que da cepa MICD-01. A cepa MORF-01 apresentou a maior taxa de crescimento, entre as três cepas estudadas. Entretanto, as cepas MICD-01 e MORF-01 apresentam um rendimento de células (R) similar ao fim do cultivo, enquanto a cepa MIRF-01 mostra um rendimento mais baixo (fig. 7b). A replicação celular depende basicamente da taxa de absorção de nutrientes e da taxa fotossintética. Como as clorofíceas entre elas a espécie de *Monoraphidium*, podem ser encontradas em ambientes repletos de recursos, estas apresentam metabolismo eficiente para converter estes recursos em reprodução. Assim, geralmente apresentam taxas de crescimento mais elevadas que as cianobactérias (Reynolds, 2006).

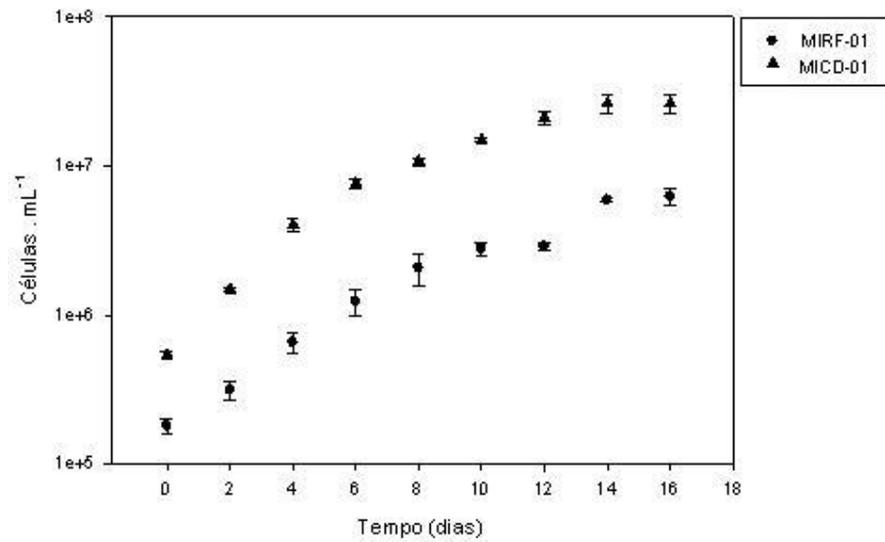


Fig. 5 – Curva de crescimento de *Microcystis*, MIRF-01 (●) e MICD-01 (▲) em meio ASM-1, com aeração, temperatura ambiente de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e sob intensidade luminosa de $140 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

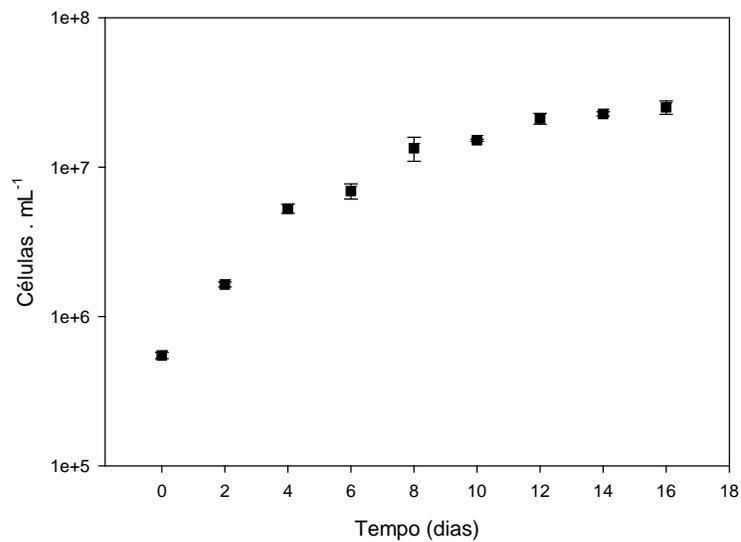


Fig. 6 – Curva de crescimento de *Monoraphidium* MORF-01 (■) em meio ASM-1, com aeração, temperatura ambiente de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e sob intensidade luminosa de $140 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

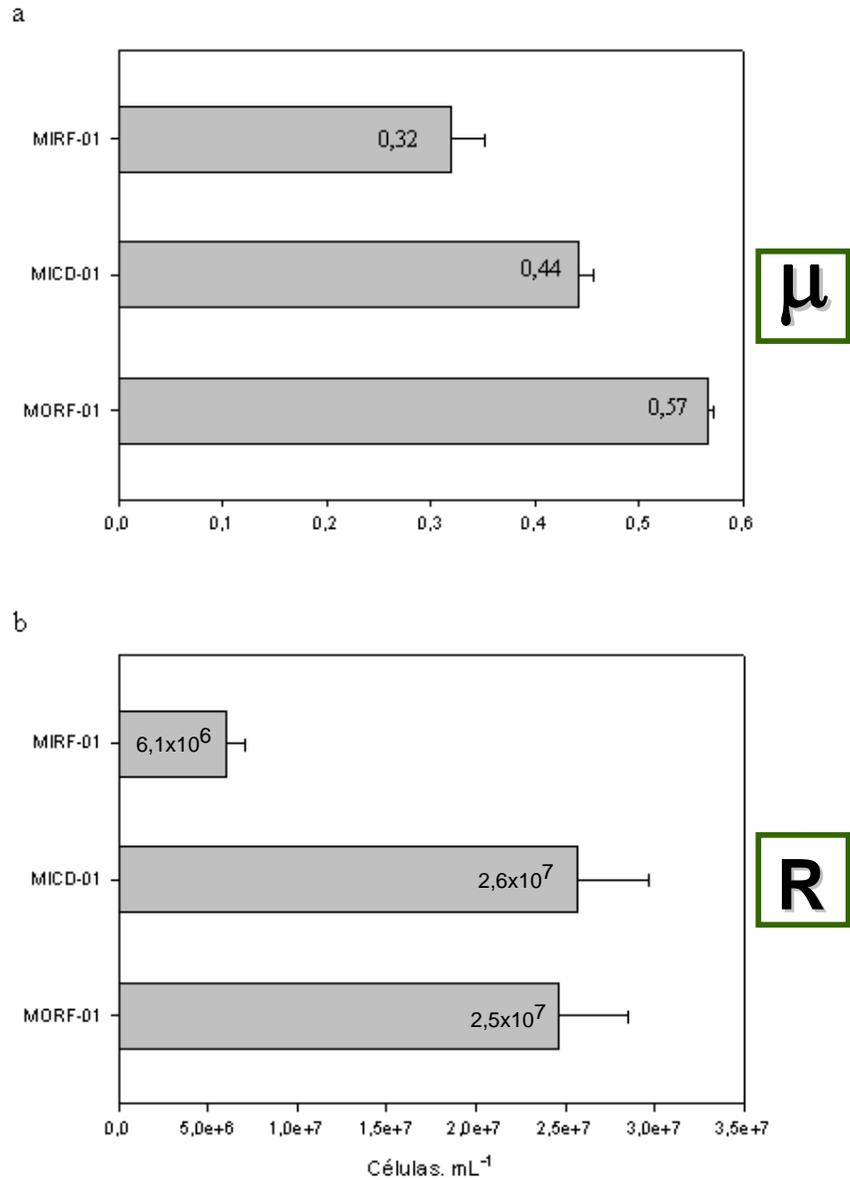


Fig. 7 - Taxas de crescimento (7a, μ) e rendimento das células (7b, R) de *Microcystis* MIRF-01, MICD-01 e *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média (n=3) \pm desvio padrão.

4.1.2 Produção de clorofila a

No caso de *Microcystis*, a concentração de clorofila a por célula durante o crescimento da cepa MIRF-01 é maior do que da cepa MICD-01 (fig. 8). No entanto, os valores diminuem a partir do dia 12, quando as células começam a entrar em fase estacionária. Os altos desvios observados nas réplicas da cepa MIRF-01 não permitem maiores considerações sobre a variação da concentração de clorofila a durante o desenvolvimento do seu cultivo.

A produção de clorofila a por célula de *Monoraphidium* MORF-01 (fig. 9) aumenta durante o crescimento, especialmente entre o dia 8 e dia 12. A partir do dia 12 a concentração começa a diminuir, como visto para *Microcystis*, devido à desaceleração do crescimento celular.

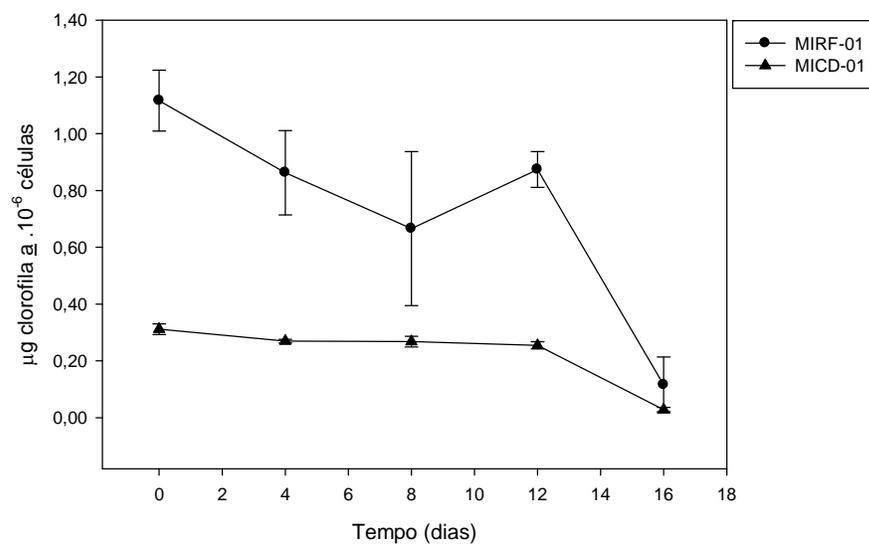


Fig. 8 - Variação da concentração de clorofila a durante o crescimento de *Microcystis* MIRF-01 (●) e MICD-01 (▲). Os resultados representam a média (n=3) \pm desvio padrão.

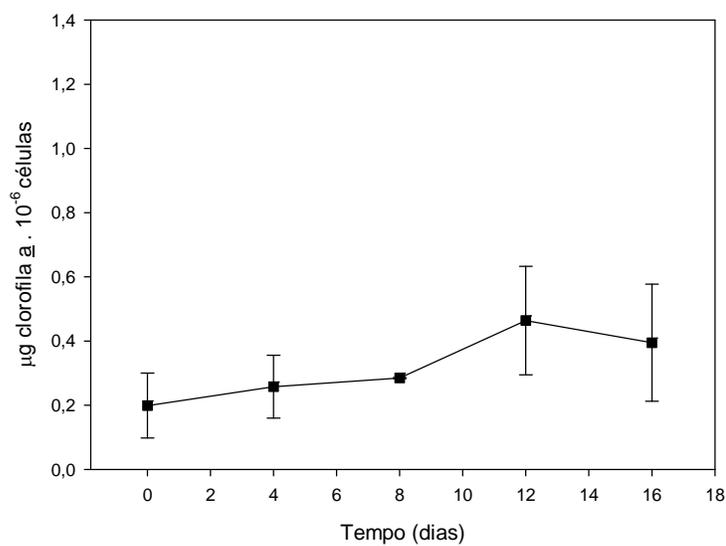


Fig. 9 - Variação da concentração de clorofila a durante o crescimento de *Monoraphidium* MORF-01 (■). Os resultados representam a média (n=3) \pm desvio padrão.

4.1.3 Produção de microcistinas pela cepa de *Microcystis* MIRF-01

A concentração de microcistinas intracelulares foi mais elevada no 16º dia de crescimento da cepa MIRF-01 (fig. 10), momento em que as células já entraram em fase estacionária. Nesta cepa, a produção não é mais intensa durante a fase exponencial como observado em outros estudos (Kearns e Hunter, 2001; Song *et al.* 2006, Watanabe *et al.*, 1989). Assim, na cepa MIRF-01, a produção de toxina ocorreu como já foi visto por Watanabe e Oishi (1983), que citaram maior toxicidade de uma cepa de *M. aeruginosa* após o término da fase exponencial e início da fase estacionária.

No meio em que as células foram cultivadas foram detectadas baixas concentrações de microcistinas dissolvidas em todos os tempos amostrais (fig. 10). Foram obtidos valores de 28, 6, 14 e 7% do total de microcistinas produzidas nos dias 4, 8, 12 e 16 de crescimento, respectivamente (fig. 10). Estas concentrações não são muito diferentes do que geralmente é encontrado no meio extracelular, cerca de 10% do conteúdo intracelular (Babica *et al.*, 2007). Isto indica que parte da toxina produzida pode ter sido excretada durante o crescimento, tendo em vista que, um estudo de Pearson *et al.* (2004) já sugeriu a existência de transporte ativo de microcistinas durante o crescimento celular. Outra possibilidade é que as toxinas podem ter sido liberadas de células que eventualmente sofreram lise durante o processo de filtração. As microcistinas dissolvidas não foram detectadas em maior concentração na fase estacionária decorrente da morte celular e conseqüente liberação para o meio extracelular, como relatam alguns estudos (Rapala *et al.*, 1997). Entretanto, como no 16º dia as células ainda estão no começo da fase estacionária, este aumento poderia ocorrer posteriormente.

A produção de toxina da cepa MIRF-01 durante o crescimento variou de 0,067 ($\pm 9\%$) a 0,154 ($\pm 16\%$) μg de microcistinas em 10^6 células. Na literatura, a apresentação dos dados mais utilizada é por peso seco, o que dificulta a comparação da produção de toxina da cepa MIRF-01 com os valores encontrados em outras cepas de *Microcystis*. Por outro lado, um

estudo realizado por Domingos (2001) apresenta em concentração de microcistinas em 10^6 células e permite fazer essa comparação. A cepa NPLJ-47, a mais tóxica entre as treze cepas de *Microcystis aeruginosa* isoladas da Lagoa de Jacarepaguá, R.J., apresentou concentração variando de 0,07ng a 0,4 μ g de microcistinas em 10^6 células. Apesar do estudo ter sido realizado em diferentes condições de cultivo e sob intensidade luminosa menor ($70\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), serve de parâmetro para produção de toxina apresentada pela cepa MIRF-01, que apresentou concentração de microcistinas intermediária.

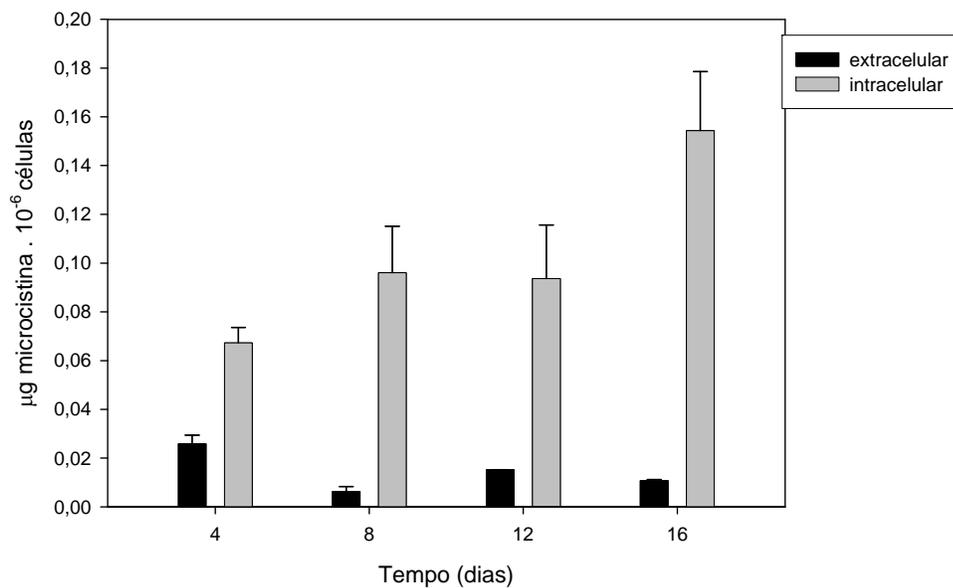


Fig. 10 - Variação da concentração de microcistinas intracelulares e extracelulares durante o crescimento de *Microcystis* MIRF-01. Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

4.2 Características ecofisiológicas de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença do meio com exudato das cepas de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01)

4.2.1 Crescimento celular

A cepa de *Monoraphidium contortum* MORF-01 cultivada na presença de 10% de exudato de *Microcystis* tóxica MIRF-01 apresentou uma taxa de crescimento (μ) significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle (meio ASM-1) (fig. 11 e 13a). O rendimento de células no final do cultivo também foi menor, embora não significativo (fig. 13b). Com 5% do exudato a taxa de crescimento também se apresentou reduzida. No entanto, o valor obtido não foi significativamente diferente do controle. No 3º dia de cultivo, o número de células/mL em relação ao controle foi menor nas três concentrações utilizadas do exudato, contudo esta redução no crescimento também não foi significativa (fig. 11).

Na presença do exudato da cepa de *Microcystis* não tóxica (MICD-01), as culturas da cepa MORF-01 não apresentaram taxas de crescimento significativamente diferentes da condição controle (fig 14a). Entretanto, na concentração de 50% do exudato no meio de cultivo, o número de células/mL obtido foi maior no terceiro e no sexto dia em relação ao controle (fig. 12), embora não significativo. O rendimento de células no final do cultivo foi menor nas concentrações de 5 e 10%, embora não tenha sido significativamente diferente em relação ao controle (fig. 14b).

Assim, baixas concentrações do exudato das duas cepas de *Microcystis* parecem ter efeito inibitório sobre o crescimento da cepa de *Monoraphidium*, mas de forma geral, pode-se assumir que os produtos excretados por estas cepas não afetam significativamente a cepa MORF-01, nessas condições utilizadas.

Algumas considerações podem ser feitas a respeito dos resultados obtidos. Por exemplo, a idade do exudato utilizado pode interferir no tipo de resposta induzida. Neste experimento, foram utilizados exudatos de culturas de *Microcystis* no final da fase exponencial, uma vez

que é nesta fase que as células estão metabolicamente ativas na qual poderia haver maior concentração de possíveis infoquímicos. Entretanto, alguns estudos observaram resultados distintos com o uso do exudato da fase exponencial (Figueredo *et al.*, 2007; Suikkanen *et al.*, 2004) ou da fase estacionária (Rengefors e Legrand, 2001). Assim, nossos resultados poderiam ser diferentes testando-se o efeito do exudato de outros momentos fisiológicos das células. Outro aspecto importante é que a condição experimental utilizada pode não ter sido favorável à produção de infoquímicos, especialmente aleloquímicos. Tendo em vista que geralmente a produção destes compostos é induzida por alguma situação de estresse (von Elert e Jüttner, 1996; Legrand *et al.*, 2003), a inclusão de um fator limitante no experimento poderia ter alterado os resultados.

Esperava-se uma resposta diferenciada entre as duas cepas de *Microcystis*, uma vez que, a cepa MIRF-01 foi isolada do mesmo ambiente que a cepa de *Monoraphidium* MORF-01, enquanto a cepa MICD-01 foi isolada de outro ambiente, o que não foi observado. Outra característica que as diferencia é que a cepa MIRF-01 é tóxica, enquanto a cepa MICD-01 nunca apresentou toxicidade por meio das técnicas utilizadas em nosso laboratório. No entanto, nenhuma das duas características parecem ter influenciado a resposta.

Como a literatura mostra que a sensibilidade aos produtos excretados por uma cepa é espécie-específica (Babica, 2007), não é de se estranhar que o exudato de uma cianobactéria não apresente um efeito sobre a clorofíceia. Se forem isolados de um mesmo ambiente, alguns organismos podem ter desenvolvido resistência a um infoquímico, por exemplo, que possua um efeito inibitório (Legrand *et al.*, 2003).

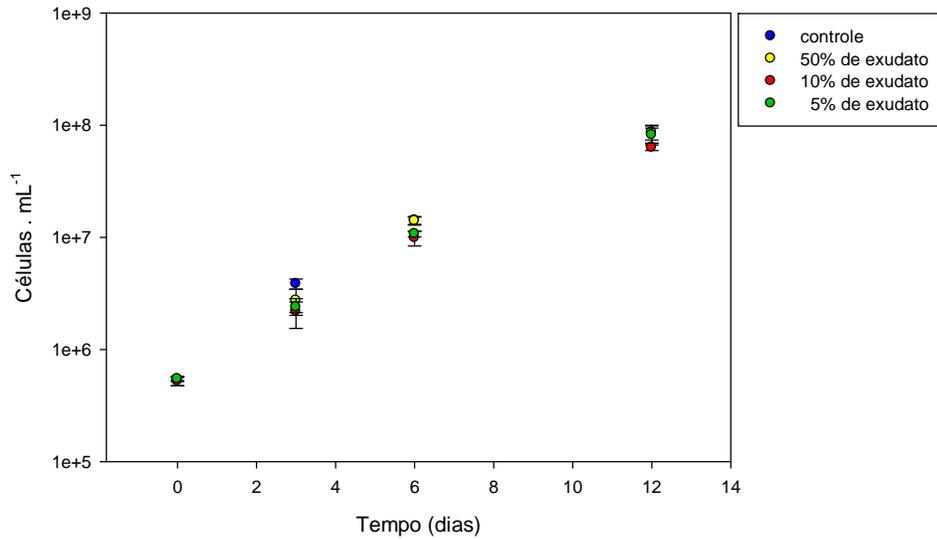


Fig. 11 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MIRF-01 no crescimento de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

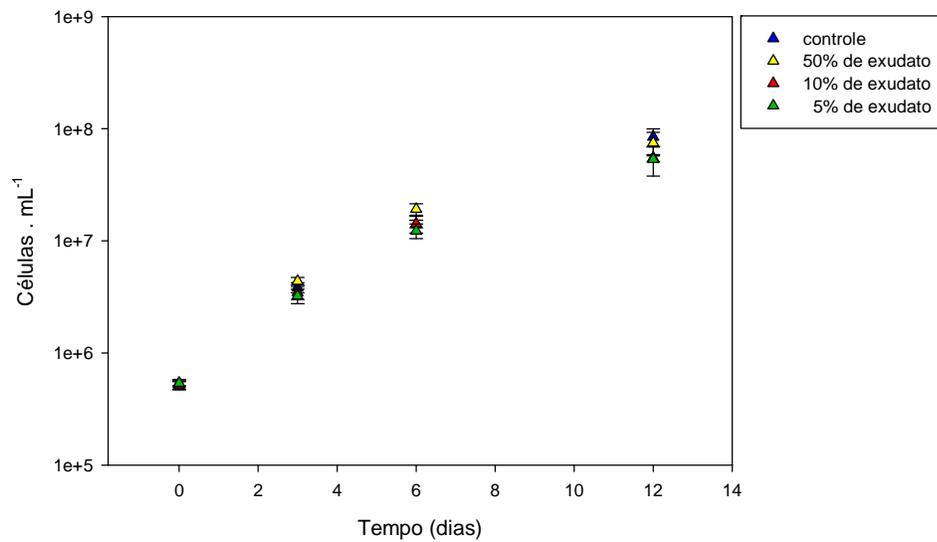


Fig. 12 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MICD-01 no crescimento de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

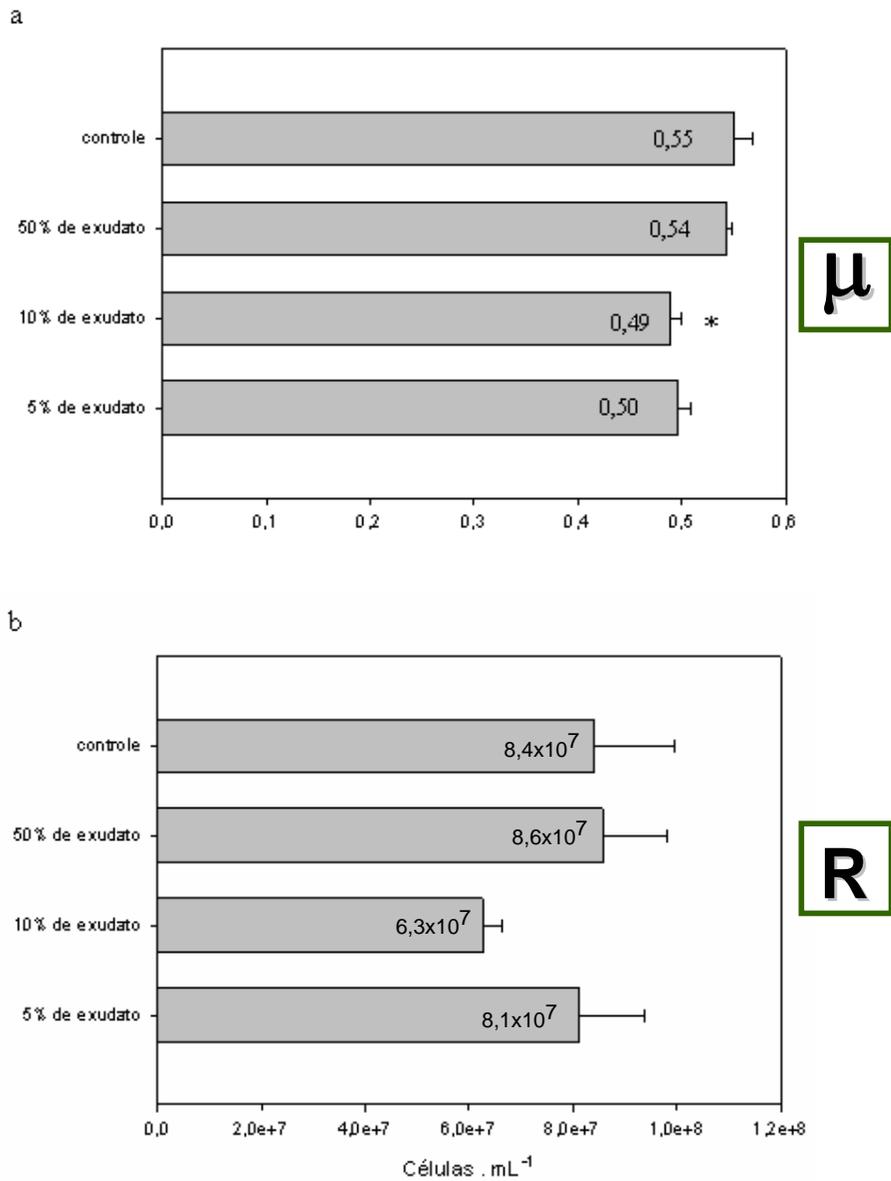


Fig. 13 - Taxas de crescimento (13a, μ) e rendimento das células (13b, R) de *Monoraphidium* MORF-01 crescida na presença de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MIRF-01. Os resultados representam a média (n=4) \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

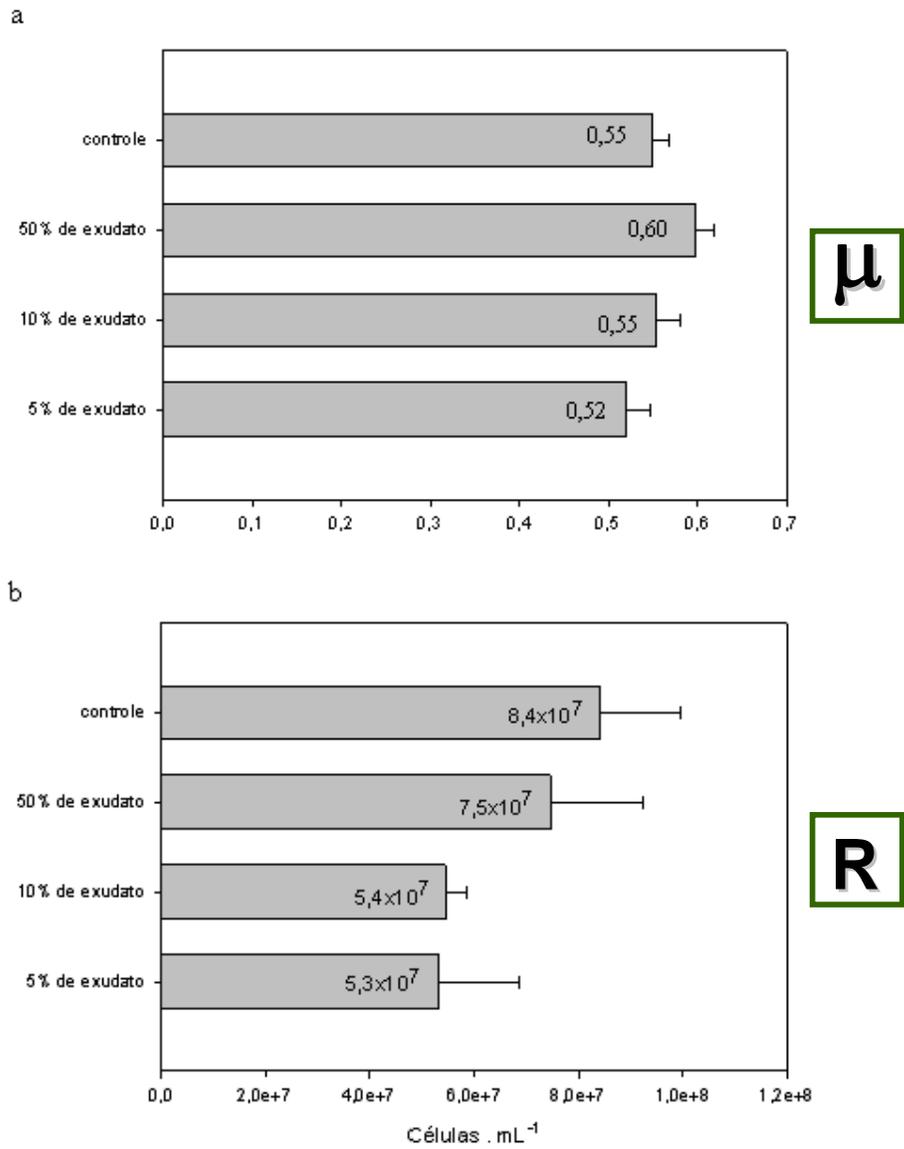


Fig. 14 - Taxas de crescimento (14a, μ) e rendimento das células (14b, R) de *Monoraphidium* MORF-01 crescida na presença de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MICD-01. Os resultados representam a média ($n=4$) \pm desvio padrão.

4.2.2 Produção de clorofila a

Os exudatos das cepas de *Microcystis* não induziram alteração significativa na concentração de clorofila a de *Monoraphidium* MORF-01. No entanto, as concentrações mais baixas do exudato da cepa MIRF-01 (5 e 10%) e da cepa MICD-01 (5%) parecem induzir um aumento do pigmento no sexto dia de crescimento (fig. 15 e 16).

Os organismos fotossintetizantes que competem num mesmo ambiente disputam pela luz e por isso, alvos bioquímicos participantes do processo fotossintético, como a síntese de pigmentos e efeitos fotooxidativos associados, podem sofrer inibição por moléculas bioativas produzidas e excretadas pelos competidores (Smith e Doan, 1999). Jia *et al.* (2008) já demonstraram que o filtrado de culturas de *Microcystis aeruginosa* foi capaz reduzir o conteúdo de clorofila a da clorofícea *Scenedesmus obliquus*. Entretanto, assim como foi observado para o crescimento celular (item 4.2.1), os produtos excretados pelas duas cepas de *Microcystis* utilizadas também não reduziram significativamente a produção de clorofila a na cepa de *Monoraphidium* MORF-01, nessas condições utilizadas.

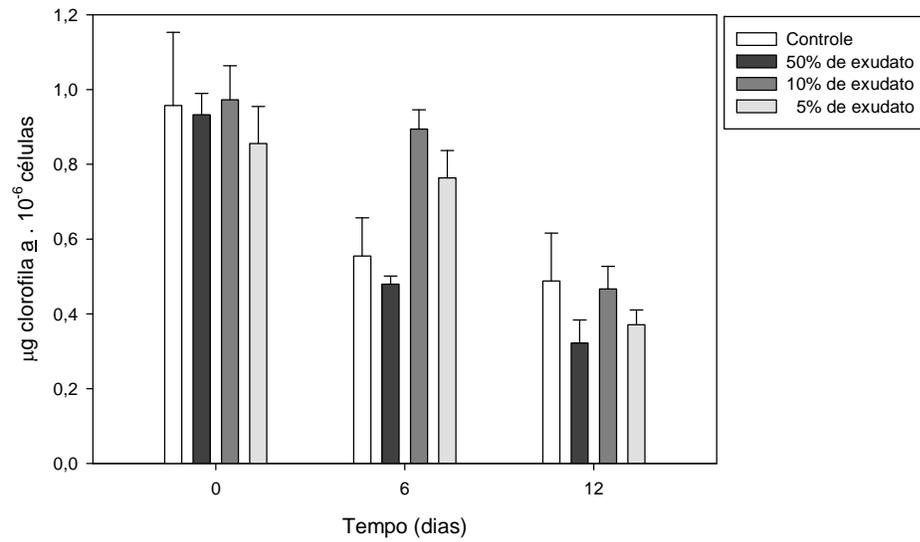


Fig. 15 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MIRF-01 na concentração de clorofila a de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

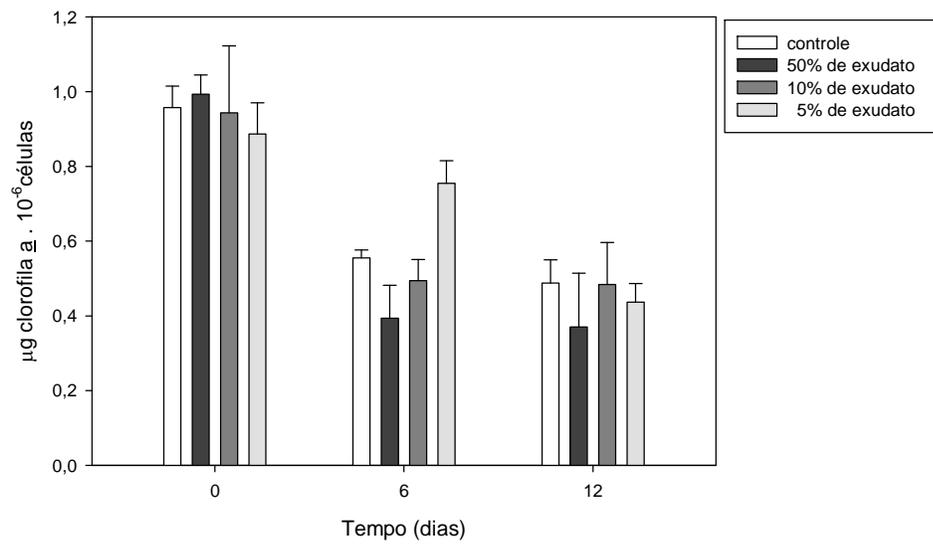


Fig. 16 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Microcystis* MICD-01 na concentração de clorofila a de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

4.3 Características ecofisiológicas de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença do meio com exudato de diferentes cepas de *Microcystis*

4.3.1 Crescimento celular

Neste experimento, a cepa de *Monoraphidium* (MORF-01) apresentou aumento do número de células quando cultivada na presença de 50% do exudato das cepas de *Microcystis*, MILJ-04 e MILJ-48, além da cepa utilizada anteriormente (MIRF-01), único caso em que o aumento foi significativo em relação ao controle ($p < 0,01$) (fig. 17). Este efeito do exudato da cepa MIRF-01 sobre as células da cepa MORF-01 não tinha sido observado no experimento anterior, discutido no item 4.2.1.

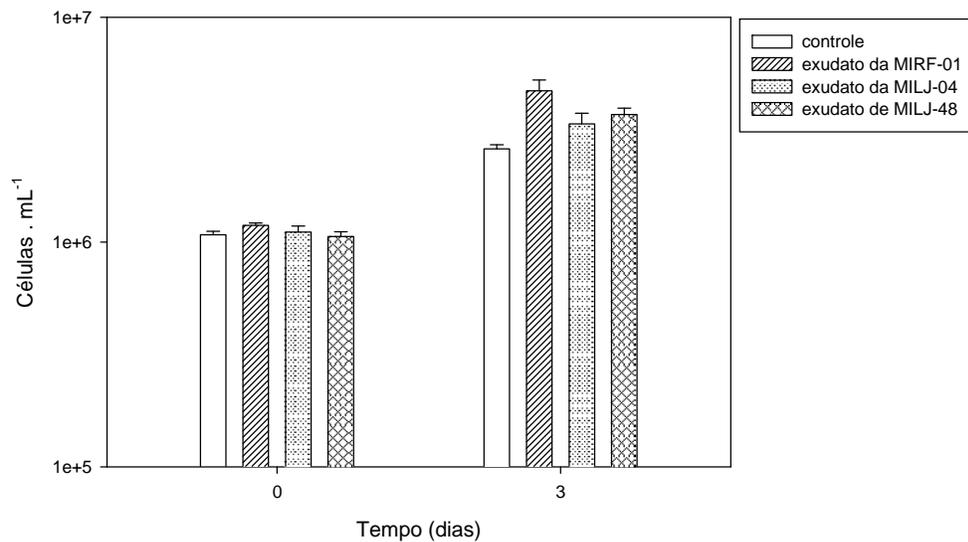


Fig. 17 - Efeito de 50% do exudato (em meio de cultivo ASM-1) de três cepas diferentes de *Microcystis* (MIRF-01, MILJ-04 e MILJ-48) no n.º de células/mL de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média ($n=4$) \pm desvio padrão.

Isto se deve, possivelmente, à mudança de uma das condições de cultivo. Como o experimento durou apenas três dias, não foram utilizados sistemas de aeração nas culturas. Estas foram apenas agitadas três vezes ao dia. Esta mudança pode ter alterado o pH do meio.

No entanto, o valor do pH nas culturas ao final do experimento não foi determinado para confirmação. Nestas condições, a cepa de *Monoraphidium* apresentou taxa de crescimento inferior (0,29) quando comparada à taxa dos cultivos com aeração (0,57).

Esta condição pode ter influenciado a resposta de *Monoraphidium* MORF-01 aos produtos excretados pelas cepas de *Microcystis* ou ter influenciado a estabilidade de alguma molécula, pois o pH em cultura sem aeração tende a ser menor do que naquelas aeradas. Em culturas da bactéria *Erwinia chrysanthemi* que cresceram em condições aeróbicas, foi observado que uma molécula sinalizadora de *quorum sensing* foi inativada devido à alcalinização do meio (Barnard e Salmond, 2004). Assim, as células logo entraram na fase estacionária, o que não foi visto em condições anaeróbicas. O estudo de Barnard e Salmond (2004) mostrou como a variação do pH pode interferir na comunicação celular através de infoquímicos. Assim, os processos físicos ou fisico-químicos induzidos pela aeração no cultivo podem ter influenciado a resposta da interação entre essas duas cepas. Nesse caso, havendo acidificação em cultivo não aerado, no qual foi verificado um aumento no número de células em relação ao controle, pode ter ocorrido uma resposta talvez a algum sinalizador.

As taxas de crescimento (fig.18a) e o rendimento (fig.18b) obtido na presença dos três exudatos foram maiores que aqueles obtidos no controle. Entretanto, somente o cultivo com o exudato da cepa MIRF-01 apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$). Apesar da produção de microcistinas ser característica comum às três cepas de *Microcystis* testadas nessa etapa, não se pode comparar a hipótese da microcistina ter participação nesta resposta, uma vez que a concentração de toxina nos exudatos não foi analisada. Sabe-se apenas que toxinas dissolvidas no meio foram detectadas durante o crescimento da cepa MIRF-01 (fig. 10b). Esta hipótese está parcialmente de acordo com os autores Sedmak e Kosi (1998) que observaram um aumento da proliferação celular de *Monoraphidium contortum* na presença de microcistina, e como os experimentos foram realizados em placas, as culturas não foram

aeradas. Entretanto, o efeito foi observado somente nas culturas crescidas sob baixa intensidade luminosa ($4 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e não foi observada proliferação das células crescidas sob intensidade mais elevada ($40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). No presente trabalho, as culturas cresceram sob alta intensidade luminosa ($140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), porém diferente da utilizada por Sedmak e Kosi (1998). Seria necessário testar o efeito da microcistina purificada sobre a cepa MORF-01 para confirmar esta hipótese.

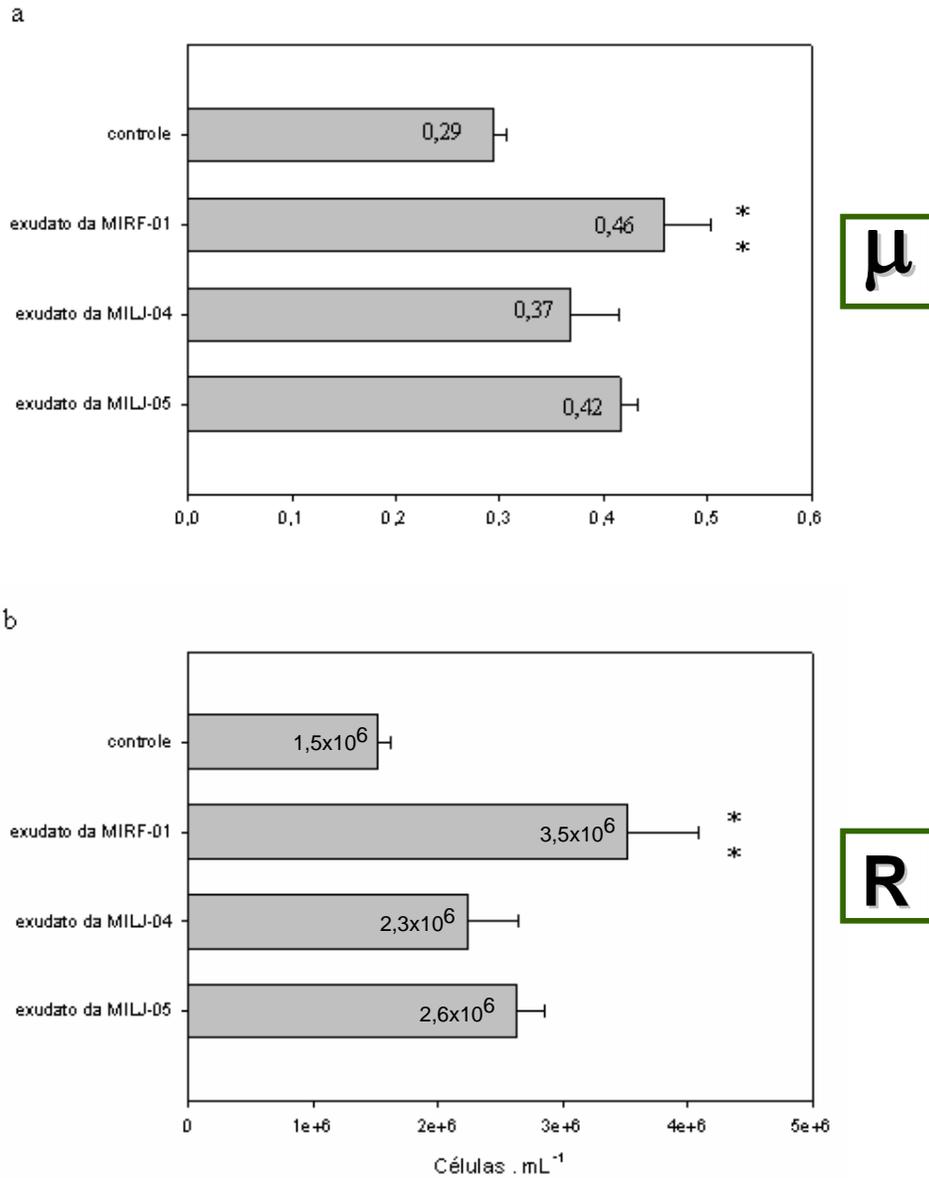


Fig. 18 - Taxas de crescimento (18a, μ) e rendimento das células (18b, R) de *Monoraphidium* MORF-01 crescida na presença de 50% do exudato da cepa MIRF-01, MILJ-04 e MILJ-48. Os resultados representam a média (n=4) \pm desvio padrão. Os ** indicam que os valores são significativos ($p < 0,01$) em relação ao controle.

4.3.2 Produção de clorofila a

A concentração de clorofila a de *Monoraphidium* foi reduzida significativamente ($p < 0,05$) somente pelo exudato de *Microcystis* MIRF-01 (fig. 19). O estímulo ao crescimento induzido pela presença de 50% do exudato de MIRF-01 foi acompanhado de redução do conteúdo de clorofila a. Esta estratégia pode não ter sido prejudicial para a cepa MORF-01, tendo em vista que no 3º dia de cultivo, a densidade celular ainda pode não implicar em auto-sombreamento. Assim, como deve ter chegado luz suficiente para as células, a redução de clorofila a não foi prejudicial naquele momento. Entretanto, os cultivos não foram acompanhados por período superior. Um experimento com maior tempo de duração poderia trazer maiores esclarecimentos sobre esse resultado.

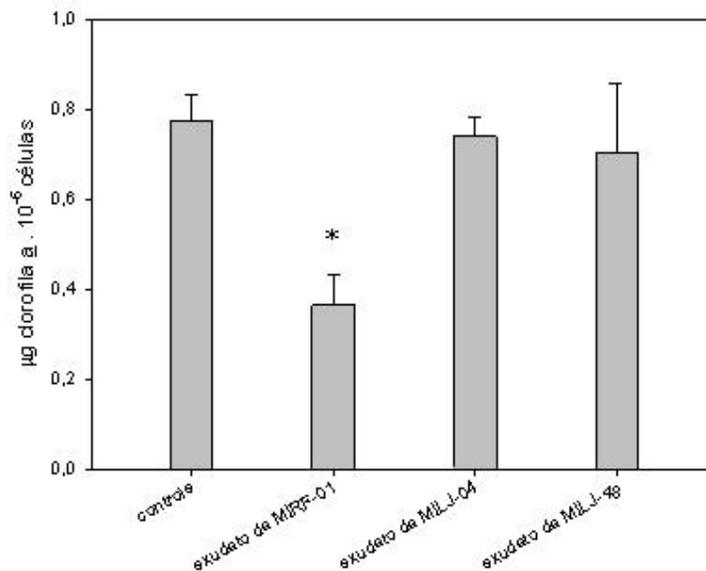


Fig. 19 - Efeito de 50% do exudato de três cepas diferentes de *Microcystis* (MIRF-01, MILJ-04 e MILJ-48) na concentração de clorofila a de *Monoraphidium* MORF-01, após três dias de cultivo. Os resultados representam a média ($n=4$) \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.4 Características ecofisiológicas de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01) na presença do meio com exudato de *Monoraphidium* (MORF-01)

4.4.1 Crescimento celular

De maneira geral, as diferentes proporções do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 não alteraram o crescimento de *Microcystis* tóxica MIRF-01, como pode ser notado nas figuras 20 e 22a. Foi observada apenas uma redução no rendimento das culturas crescidas com 5% do exudato, embora não significativa (fig. 22b).

Entretanto, a concentração de 10% do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) na taxa de crescimento de *Microcystis* não tóxica MICD-01 (fig. 23a). O rendimento das células (fig. 23b) de *Microcystis* MICD-01 não foi significativamente diferente.

Assim, baixas concentrações do exudato de *Monoraphidium* parecem ter algum efeito sobre o crescimento da *Microcystis* MICD-01, nestas condições utilizadas

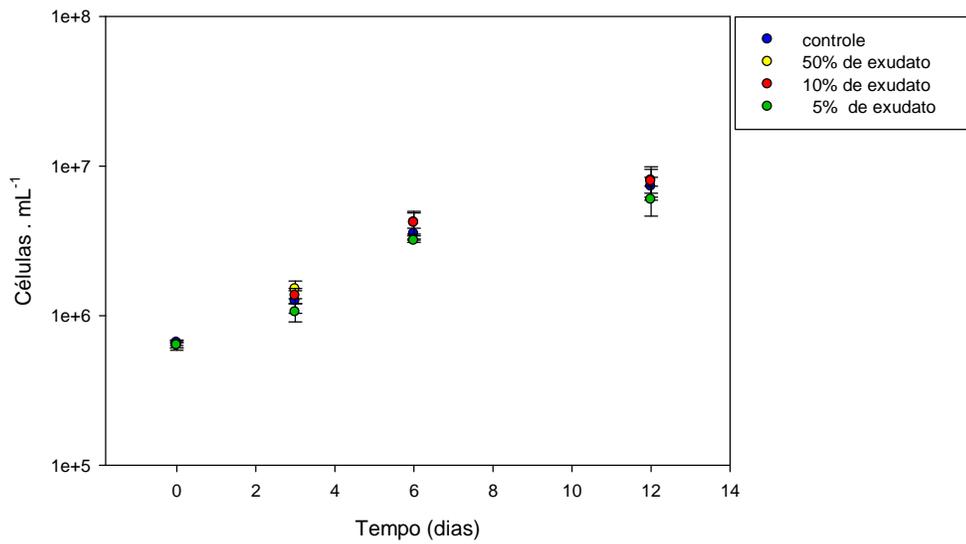


Fig. 20 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 no crescimento de *Microcystis* MIRF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

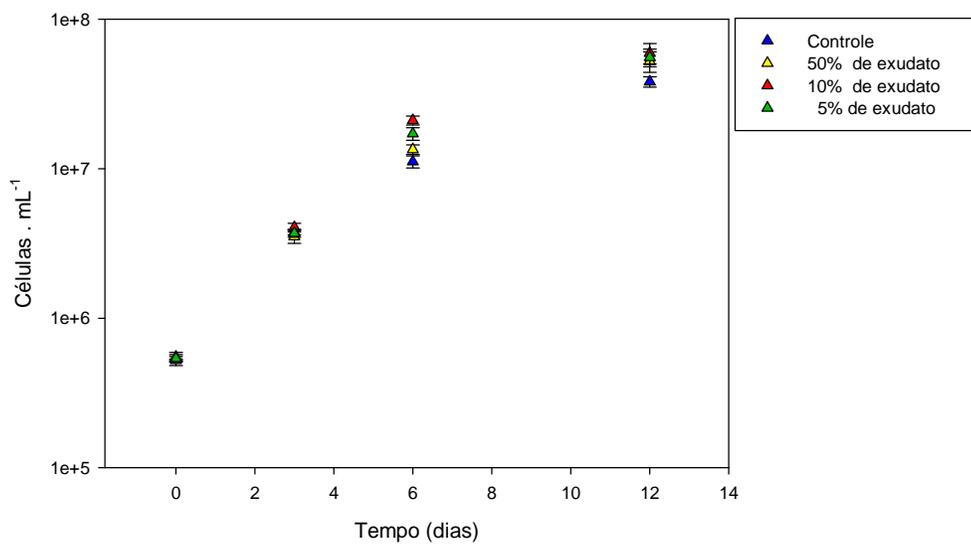
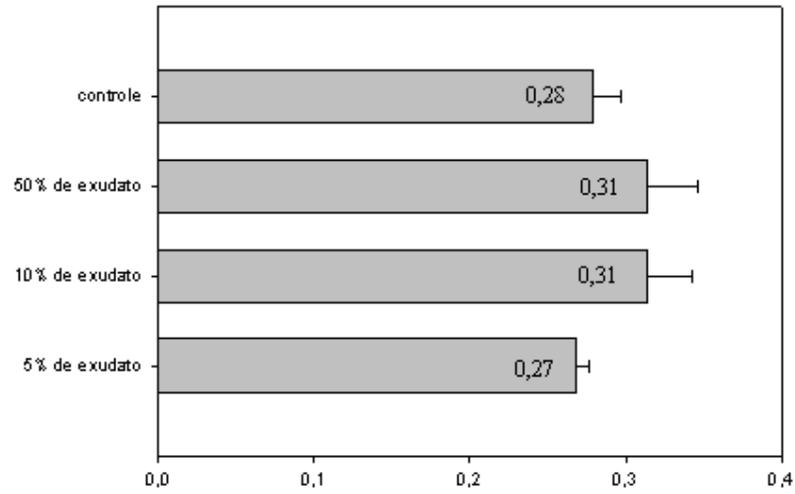


Fig. 21 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 no crescimento de *Microcystis* MICD-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

a



b

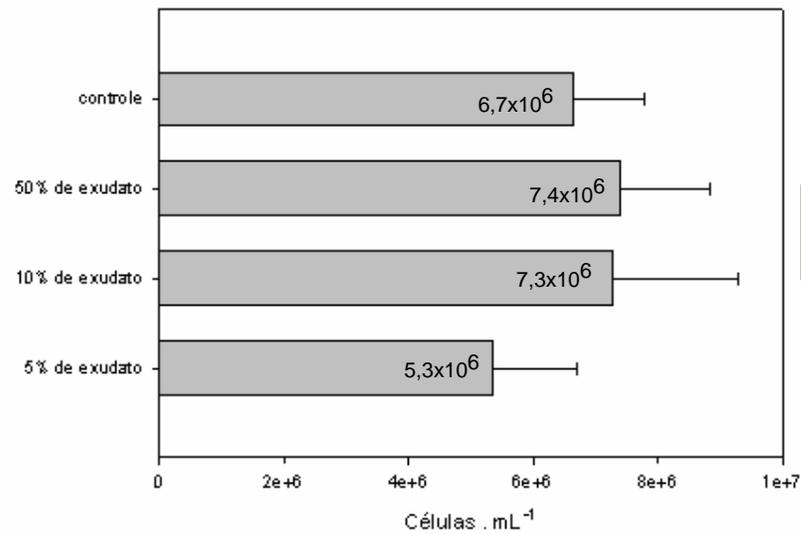
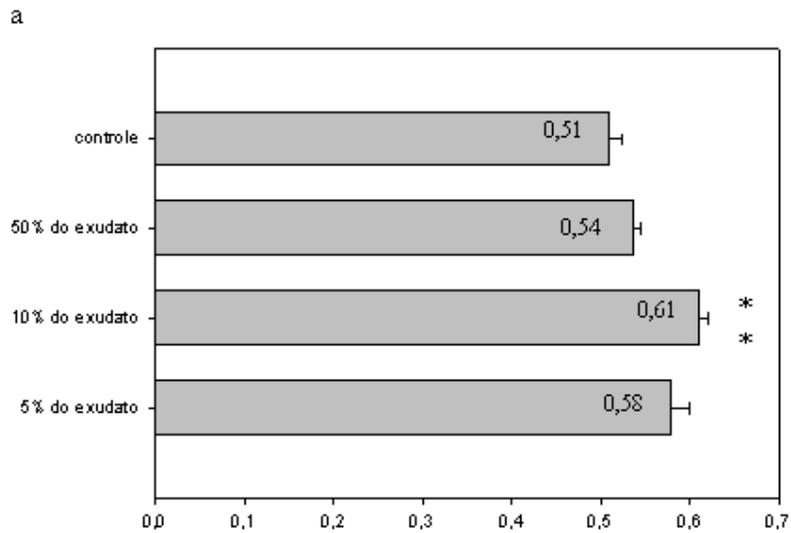
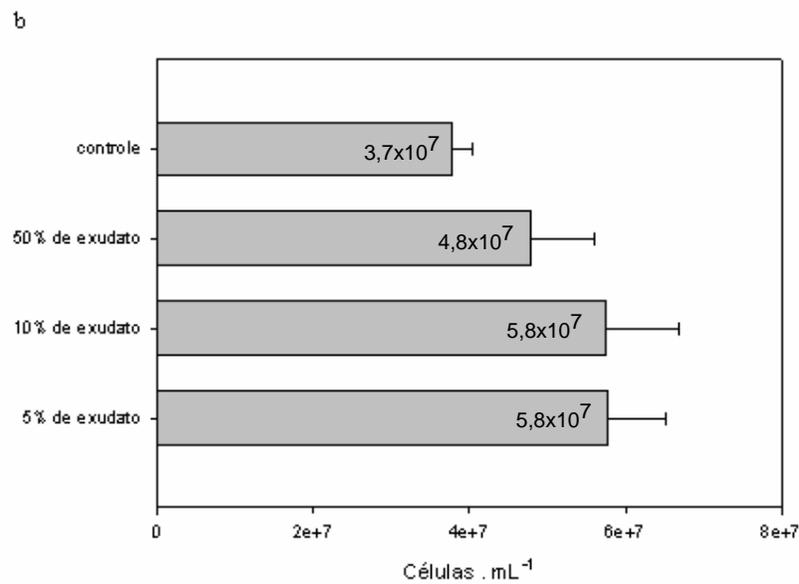


Fig. 22 - Taxas de crescimento (22a, μ) e rendimento das células (22b, R) de *Microcystis* MIRF-01 crescida na presença de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média ($n=4$) \pm desvio padrão.



μ



R

Fig. 23 - Taxas de crescimento (23a, μ) e rendimento das células (23b, R) de *Microcystis* MICD-01 crescida na presença de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01. Os resultados representam a média ($n=4$) \pm desvio padrão. Os ** indicam que o valor é significativo ($p<0,01$) em relação ao controle.

4.4.2 Produção de clorofila a

A concentração de clorofila a não foi alterada significativamente nas culturas das duas cepas de *Microcystis* crescidas com o exudato de *Monoraphidium* MORF-01. Oliveira (1997) também observou que a matéria orgânica excretada pela espécie de clorofícea *Monoraphidium convolutum* em cultivos de 7, 14 e 21 dias de crescimento não induziram aumento das concentrações de clorofila a em cultivos da cianobactéria *Synechocystis aquatilis* *f. aquatilis*.

Entretanto, apesar dos desvios altos pode-se observar uma redução no conteúdo de clorofila a de *Microcystis* tóxica MIRF-01 no 6º dia (concentrações de 5 e 10%) e um aumento no 12º (concentração de 50%) em relação ao controle (fig. 24). Já no caso da *Microcystis* não tóxica MICD-01, houve uma redução no conteúdo de clorofila a partir do 6º dia (concentração de 50% em comparação com as outras concentrações) (fig. 25).

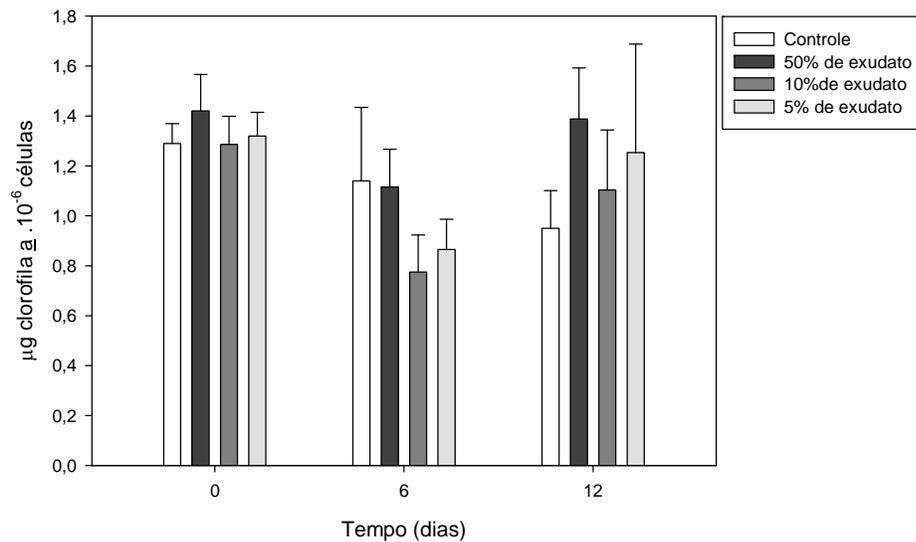


Fig. 24 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 na concentração de clorofila a de *Microcystis* MIRF-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

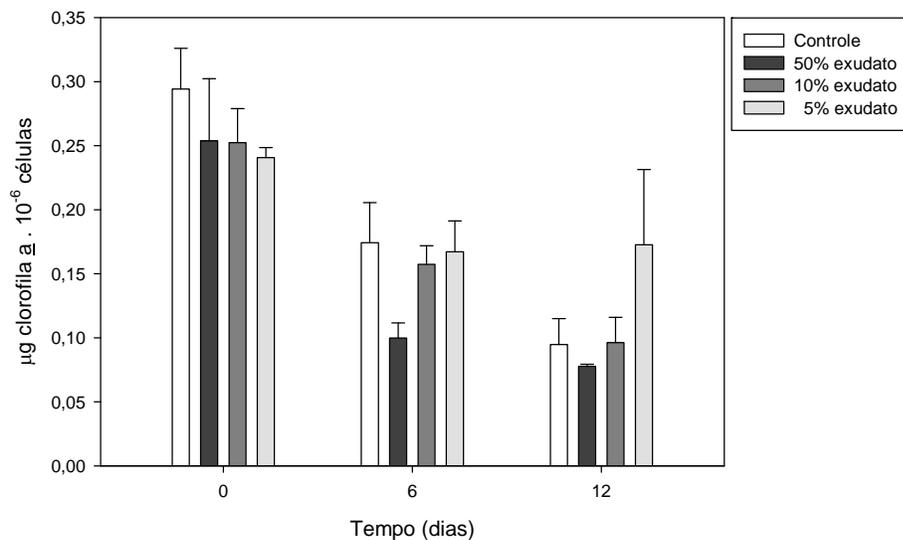


Fig. 25 - Efeito de três concentrações (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 na concentração de clorofila a de *Microcystis* MICD-01. Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão.

4.5 Crescimento de *Microcystis* (MIRF-01 ou MICD-01) e de *Monoraphidium* (MORF-01) em condições de cultivo misto

A partir do cultivo misto entre *Monoraphidium* MORF-01 e *Microcystis* MIRF-01, realizado na proporção de 1:1 da densidade celular de ambas as espécies e com duração de seis dias, foi observado que o crescimento de ambas foi reduzido se for comparado aos cultivos monoespecíficos (fig.26). Os dados da taxa de crescimento (fig. 28a) e do rendimento de células ao final de cultivo confirmam essa redução do crescimento (fig.28b). O rendimento da cepa MORF-01 sofreu uma redução de 45% após seis dias de cultivo misto, quando comparado à condição monoespecífica; enquanto o rendimento da cepa MIRF-01 sofreu uma redução de 35%. Ao final desses seis dias de cultivo misto, a cepa de *Monoraphidium* MORF-01 apresentou melhor crescimento do que *Microcystis* MIRF-01, ficando com 73% do total de número de células.

O cultivo misto entre *Monoraphidium* MORF-01 e *Microcystis* MICD-01, realizado também na proporção de 1:1 e com duração de seis dias, resultou em menor crescimento para ambas as cepas se comparado aos cultivos monoespecíficos (fig.27). As taxas de crescimento e o rendimento de células ao final de cultivo misto foram menores que em condições monoespecíficas, como pode ser observado nas figuras 29a e 29b, respectivamente. O rendimento da cepa MORF-01 sofreu uma redução de 45% após seis dias de cultivo misto, quando comparado à condição monoespecífica; enquanto o rendimento da cepa MICD-01 sofreu uma redução de 35%. No terceiro dia de cultivo misto notou-se que a cepa MICD-01 apresentava maior n°. de células/mL. Entretanto, no 6º dia, ambas as cepas tinham atingido densidades celulares próximas (fig.27).

O tratamento estatístico desse experimento não encontrou diferenças significativas (quando $p \leq 0,05$), embora os dados apresentados tenham mostrado diferenças de crescimento. A tabela 5 mostra os valores de p obtidos pelo teste U de *Mann-Whitney* ao comparar as taxas de crescimento (μ) e os rendimentos celulares (R) dos cultivos monoespecíficos com os

cultivos mistos. Isto pode ter ocorrido devido à limitação do teste U de *Mann-Whitney*, tendo em vista que com apenas três amostras (n=3) o próprio programa utilizado indica que é difícil encontrar significância ao comparar os dados.

Tabela 5: Valores de p obtidos pelo teste U de *Mann-Whitney* ao comparar as taxas de crescimento (μ) e os rendimentos celulares (R) dos cultivos monoespecíficos com os cultivos mistos (CM) de *Monoraphidium* MORF-01 e *Microcystis* MIRF-01 e MICD-01.

Cultivos monoespecíficos x mistos (CM)	μ	R
MORF-01 x MORF-01 (CM)	p= 0,100	p= 0,100
MIRF-01 x MIRF-01 (CM)	p= 0,200	p= 0,200
MORF-01 x MORF-01 (CM)	p= 0,100	p= 0,100
MICD-01 x MICD-01 (CM)	p= 0,100	p= 0,100

O fato de *Monoraphidium* MORF-01 ter apresentado um melhor crescimento (73% do total do n°. de células do cultivo misto) na presença de *Microcystis* MIRF-01, mas não na presença de *Microcystis* MICD-01 pode ser explicado, em parte, pela diferença de tamanho entre as células das duas cepas de *Microcystis*. As células da cepa MICD-01 são menores e apresentam taxa de crescimento maior que as células da cepa MIRF-01. Além disso, a cepa MICD-01 possui um rendimento maior que o da cepa MIRF-01 e similar ao da MORF-01. Dessa forma, as duas cepas mantiveram seus ritmos de crescimento na presença da cepa de *Monoraphidium*, cuja redução na taxa de crescimento foi similar em ambos os cultivos mistos quando comparados com seu cultivo monoespecífico (fig.28a e 29a).

A otimização da utilização de energia por clorófitas do gênero *Monoraphidium* e cianobactérias do gênero *Microcystis* se dá de forma distinta, pois esses organismos possuem diferentes estratégias para sobreviver num ambiente (Reynolds, 2006). As clorófitas apresentam maiores taxas de crescimento e alocam seus recursos preferencialmente na reprodução quando comparadas às cianobactérias, para as quais ocorre o inverso. Nas

condições experimentais utilizadas, as cepas de *Microcystis* foram capazes de coexistir com a cepa de *Monoraphidium*. Entretanto, o potencial de crescimento de cada cepa mostrou-se reduzido nessa condição. O menor crescimento em cultivos mistos não deve estar associado à competição por nutrientes. Os cultivos foram acompanhados por seis dias e até esse momento, ainda teriam nutrientes suficientes no meio de cultura. Deve-se considerar também que nesses cultivos foi inoculado o dobro de células do que na condição monoespecífica. Assim, um sombreamento maior nos cultivos mistos e como consequência menor disponibilidade luminosa pode ter contribuído como um dos fatores responsáveis pelo menor crescimento.

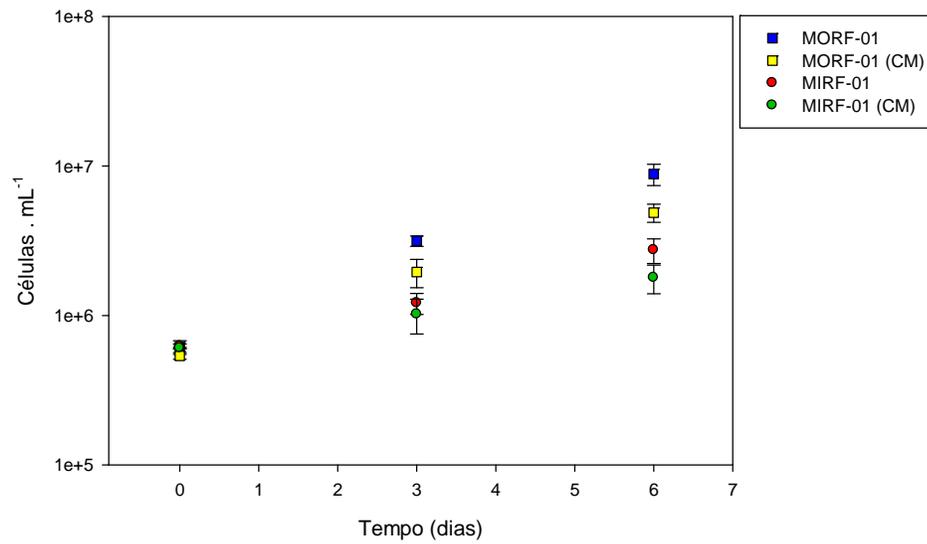


Fig. 26 - Crescimento de *Monoraphidium* MORF-01 (■) e de *Microcystis* MIRF-01 (●) em condições mono específicas e em cultivo misto (CM ■ e ●, respectivamente) na proporção de 1:1. Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

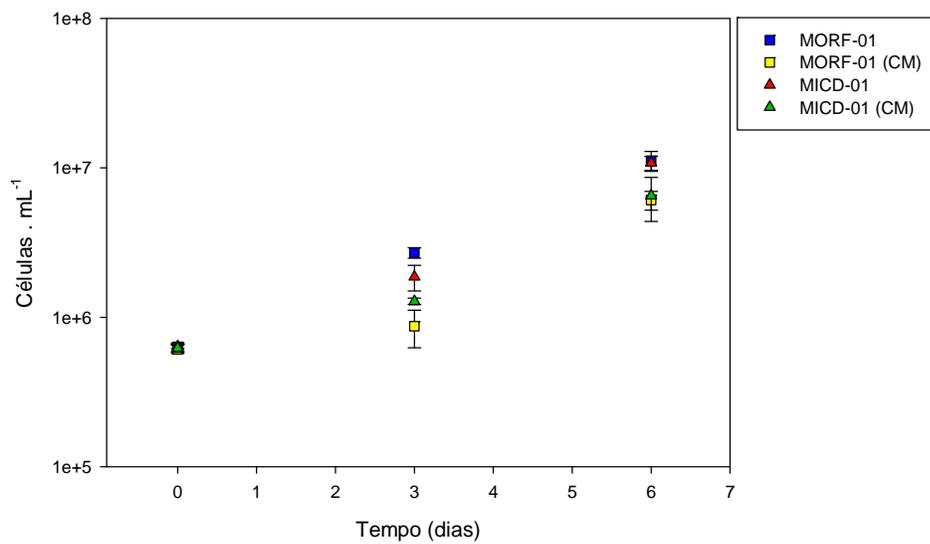
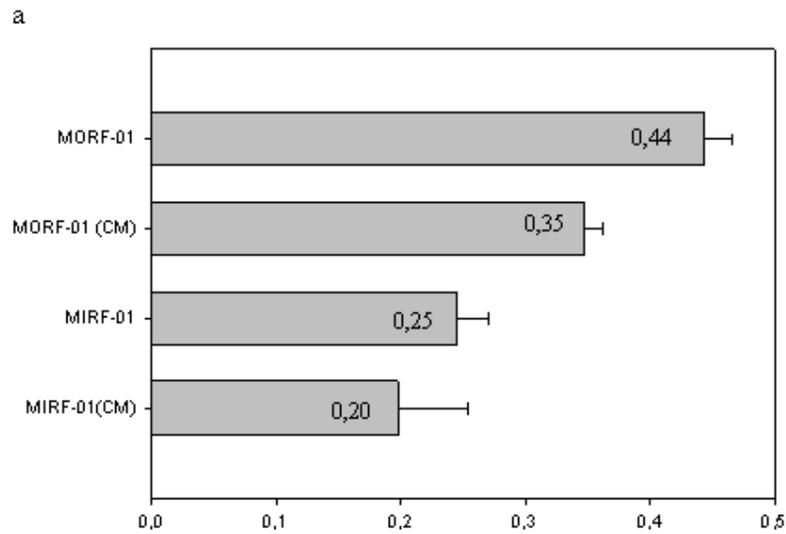
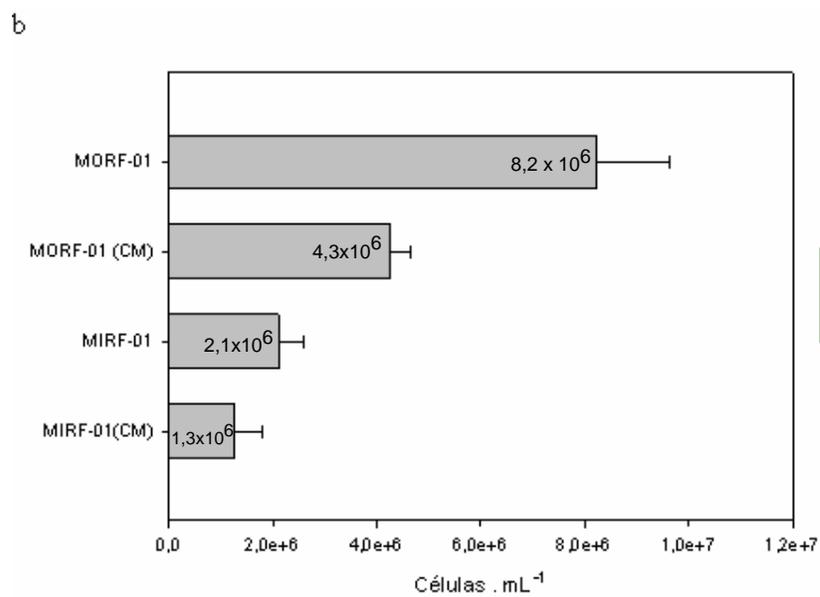


Fig. 27 - Crescimento de *Monoraphidium* MORF-01 (■) e de *Microcystis* MICD-01 (▲) em condições mono específicas e em cultivo misto (CM ■ e ▲, respectivamente) na proporção de 1:1. Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.



μ



R

Fig. 28 - Taxas de crescimento (28a, μ) e rendimento celular (28b, R) de *Microcystis* MIRF-01 e de *Monoraphidium* MORF-01 em condições mono específicas e em cultivo misto (CM) na proporção de 1:1. Os resultados representam a média (n=3) \pm desvio padrão.

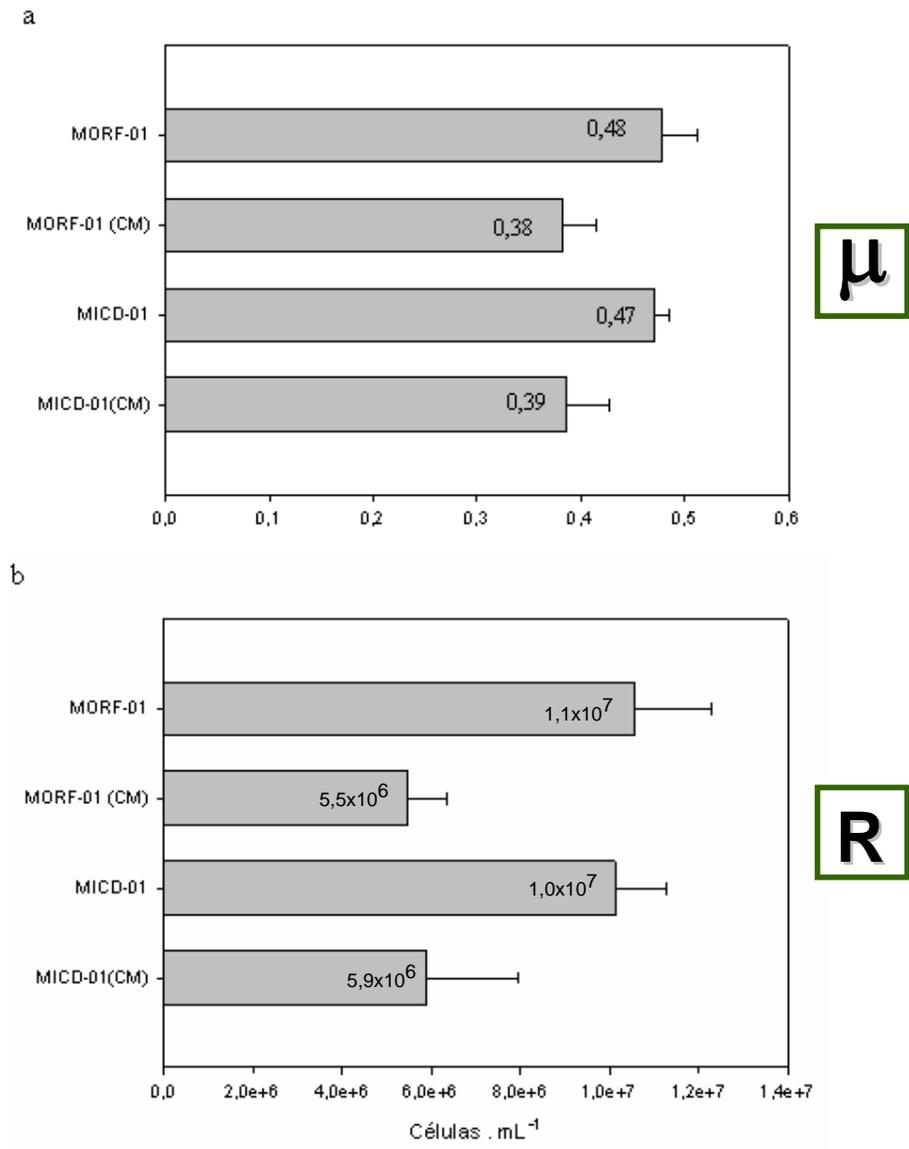


Fig. 29 - Taxas de crescimento (29a, μ) e rendimento celular (29b, R) de *Microcystis* MICD-01 e de *Monoraphidium* MORF-01 em condições monoespecíficas e em cultivo misto (CM) na proporção de 1:1. Os resultados representam a média (n=3) \pm desvio padrão.

4.6 Características ecofisiológicas de *Microcystis* (MIRF-01) e de *Monoraphidium* (MORF-01) na presença de meio com exudatos de cultivos mistos

4.6.1 Crescimento celular

Os exudatos dos cultivos mistos (CM) A, B e C foram obtidos a partir de culturas de seis dias de crescimento, cujo inóculo inicial foi de 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01, 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01, 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01, respectivamente. O crescimento de *Monoraphidium* MORF-01 com exudato de cultivo misto tendeu a sofrer efeito inibitório, embora não significativo, nas duas condições de CM B e CM C, como pode ser observado na figura 30. As taxas de crescimento e os rendimentos da cepa MORF-01 na presença dos exudatos destes três cultivos mistos são mostrados na figura 32a e 32b, respectivamente.

No 2º dia, as culturas crescidas com 100% de exudatos do CM B e do CM C sofreram uma inibição do crescimento de 31% e 52%, respectivamente (tabela 6). Entretanto, no 4º dia, a inibição foi observada somente nas culturas crescidas com 100% de exudato do CM C. O valor baixou para 42% e manteve-se até o 6º dia (tabela 6). O rendimento foi 46% menor (tabela 6) comparado ao controle, embora não significativo também. Assim, a resposta inibitória observada parece estar relacionada à quantidade de células da cepa de *Monoraphidium* (MORF-01) presentes inicialmente na cultura da qual foi obtido o exudato, o que será discutido mais adiante.

O crescimento de *Microcystis* MIRF-01 com exudatos de cultivos mistos também sofreu efeito inibitório, embora não significativo (fig. 33a). Como mostra a figura 31, no 2º dia, as culturas com 50% de exudatos do CM A, CM B e do CM C obtiveram uma inibição de 37, 27 e 48%, respectivamente (tabela 7). No 4º dia a inibição observada nas culturas com 50% de exudato do CM A, do CM B e CM C, foi reduzida para a 29, 18 e 34% (tabela 7). As

culturas na presença do exudato do CM C sofreram o maior efeito inibitório, mas obtiveram o maior rendimento no 6º dia (fig. 33b)

Os exudatos obtidos a partir de cultivos mistos foram utilizados com a intenção de investigar a possível produção de aleloquímicos na presença do competidor, como observado por Soares (2008). Essa condição de estresse poderia estimular a produção de algum composto que não estaria sendo produzido em cultivos monoespecíficos. Todavia, comparando os valores de taxas de crescimento dos experimentos em que foram utilizados os exudatos de culturas monoespecíficas (50%) com os valores de taxas de crescimento dos experimentos em que foram utilizados os exudatos de cultivos mistos (50%), não foram observadas diferenças.

Vale comentar que nestes experimentos foram adotados intervalos mais curtos para amostragem, uma vez que dados da literatura mostram que o efeito causado pela adição de um exudato pode ser perdido após curto tempo de exposição, devido à degradação por luz ou bactérias ou pela recuperação do organismo alvo (Gleason e Paulson, 1984; Suikkanen *et al.*, 2004; Windust *et al.*, 1997). Este efeito temporário foi observado em algumas situações, como por exemplo, o atraso no crescimento das culturas na presença de exudatos de cultivos mistos no 2º dia de cultivo (figuras 30 e 31) com posterior recuperação.

Outra diferença é que o efeito dos exudatos de cultivos mistos na concentração de 100 % foi que se mostrou mais efetivo (CM B e CMC), como mostra a tabela 5. No caso da adição dos exudatos de cultivos monoespecíficos, a maior concentração testada foi 50%.

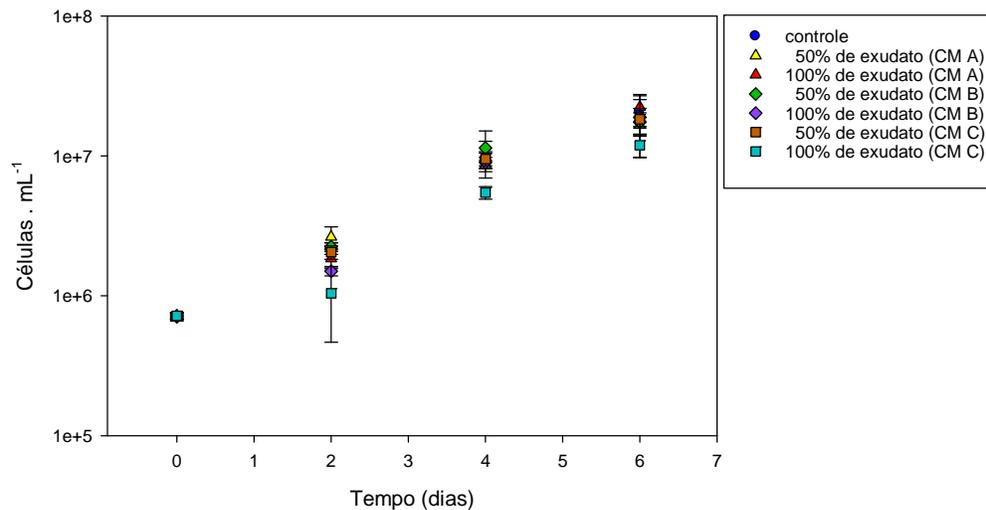


Fig. 30 - Efeito de duas concentrações (50 e 100%) de exudatos de três cultivos mistos (seis dias) distintos no crescimento de *Monoraphidium* MORF-01. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

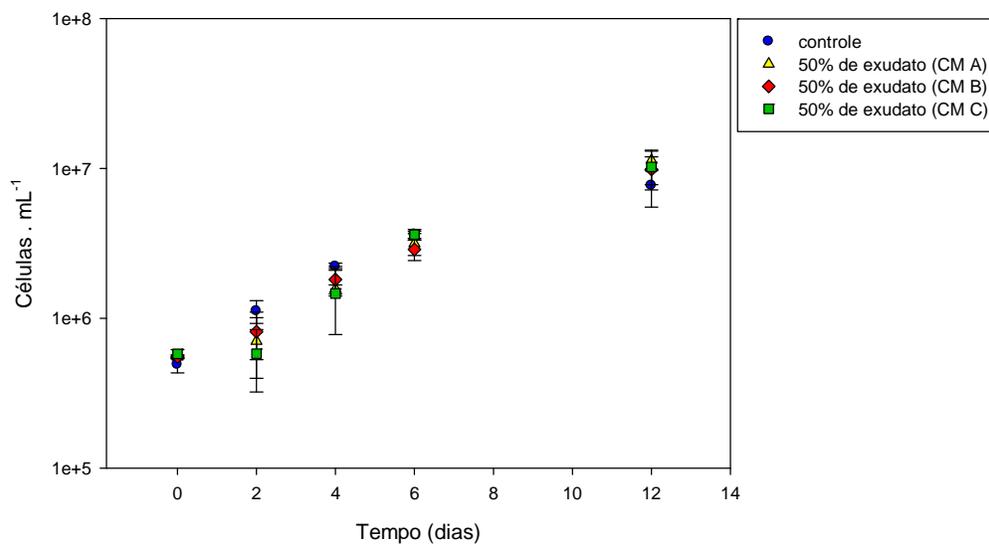
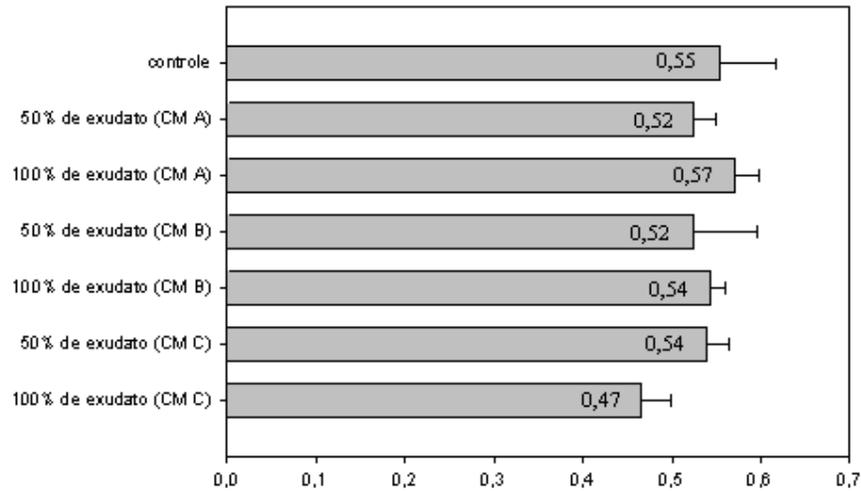


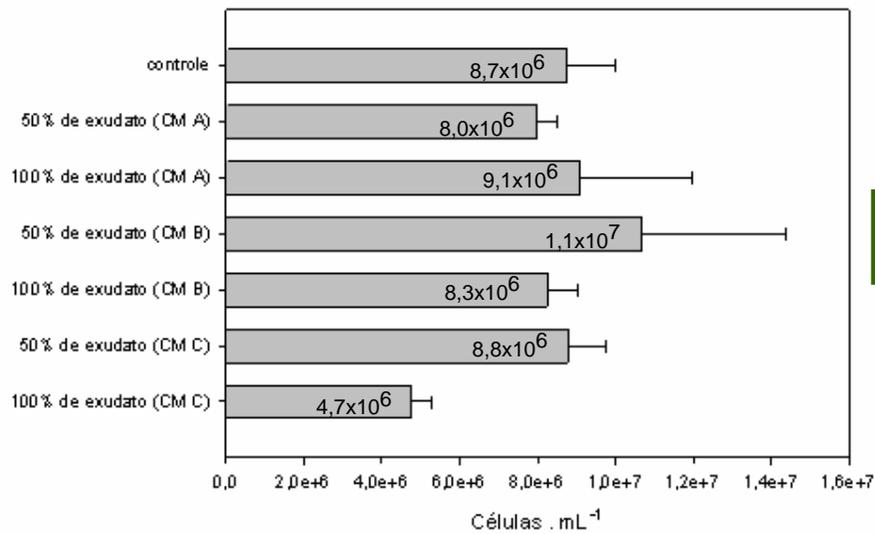
Fig. 31 - Efeito de 50% dos exudatos de três cultivos mistos (de seis dias) distintos no crescimento da de *Microcystis* MIRF-01. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B) e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

a



μ

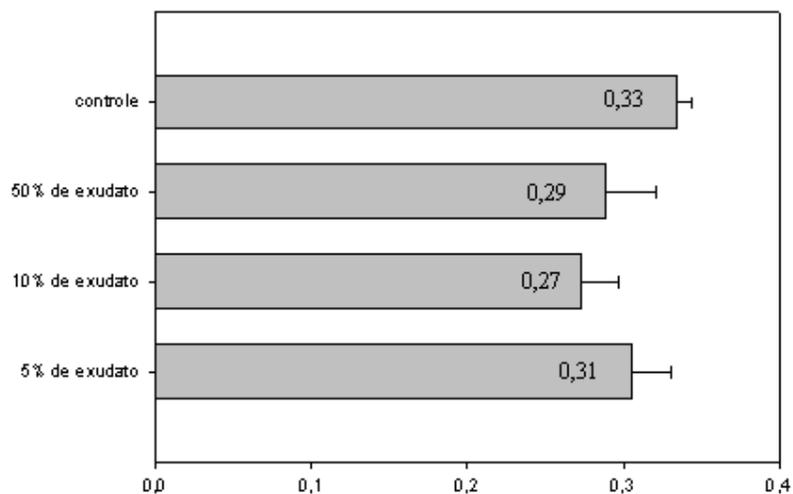
b



R

Fig. 32 - Taxas de crescimento (32a, μ) e rendimento celular (32b, R) de *Monoraphidium* MORF-01 na presença de duas concentrações (50 e 100%) de exudatos de três cultivos mistos (de seis dias) distintos. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

a



b

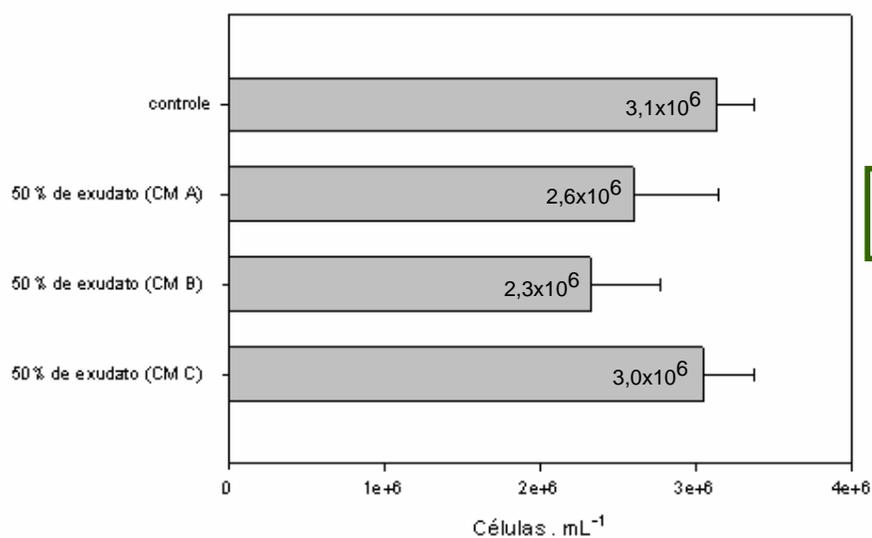


Fig. 33 - Taxas de crescimento (33a, μ) e rendimento celular (33b, R) da cepa MIRF-01 na presença de duas concentrações (50 e 100%) de exudatos de três cultivos mistos (de seis dias) distintos. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Tabela 6: Efeito do meio com exudatos de três cultivos mistos distintos no crescimento da cepa *Monoraphidium* (MORF-01)

condições de cultivo	densidade celular (nº de células/mL)				% de inibição celular			% de redução do R
	dia 0	dia 2	dia 4	dia 6	dia 2	dia 4	dia 6	dia 6
controle	$7,06 \times 10^5$	$2,18 \times 10^6$	$9,44 \times 10^6$	$2,04 \times 10^7$	-	-	-	-
50% exu CM A	$7,13 \times 10^5$	$2,64 \times 10^6$	$8,68 \times 10^6$	$1,66 \times 10^7$	-21	8	19	9
100% exu CM A	$7,19 \times 10^5$	$1,85 \times 10^6$	$9,82 \times 10^6$	$2,24 \times 10^7$	15	-4	-10	-4
50% exu CM B	$7,08 \times 10^5$	$2,24 \times 10^6$	$1,14 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	-3	-21	14	-22
100% exu CM B	$7,17 \times 10^5$	$1,50 \times 10^6$	$8,97 \times 10^6$	$1,88 \times 10^7$	31	5	8	6
50% exu CM C	$7,15 \times 10^5$	$2,05 \times 10^6$	$9,50 \times 10^6$	$1,83 \times 10^7$	6	-1	10	-1
100% exu CM C	$7,18 \times 10^5$	$1,04 \times 10^6$	$5,46 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	52	42	42	46

Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). R representa o rendimento celular. Os valores com sinal negativo na frente (-) significam crescimento celular.

Tabela 7: Efeito do meio com exudatos de três cultivos mistos distintos no crescimento da cepa de *Microcystis* (MIRF-01)

condições de cultivo	densidade celular (nº de células/mL)				% de inibição celular			% de redução do R
	dia 0	dia 2	dia 4	dia 6	dia 2	dia 4	dia 6	dia 6
controle	$4,91 \times 10^5$	$1,12 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$3,62 \times 10^6$	-	-	-	-
50% exu CM A	$5,54 \times 10^5$	$7,04 \times 10^5$	$1,57 \times 10^6$	$3,16 \times 10^6$	37	29	13	17
50% exu CM B	$5,54 \times 10^5$	$8,14 \times 10^5$	$1,81 \times 10^6$	$2,88 \times 10^6$	27	18	21	11
50% exu CM C	$5,79 \times 10^5$	$5,81 \times 10^5$	$1,46 \times 10^6$	$3,62 \times 10^6$	48	34	0	-31

Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). R representa o rendimento celular. Os valores com sinal negativo na frente (-) significam crescimento celular.

4.6.2 Produção de clorofila a

Os exudatos dos cultivos mistos influenciaram a concentração de clorofila a na cepa de *Monoraphidium* MORF-01 (fig. 34), como mostra a aparência das culturas no 6º dia de cultivo (fig.36). A partir do 4º dia de cultivo, foi detectada uma redução na concentração de clorofila a nas culturas crescidas com os exudatos do CM B e CM C e a partir do 6º dia uma pequena redução com o exudato do CM A (figura 34). Embora somente na condição em que foi utilizado 100% do exudato do CM C a redução de clorofila a tenha sido significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, nota-se que a indução de clorose está relacionada à quantidade de células da cepa de *Monoraphidium* (MORF-01), presentes inicialmente na cultura da qual foi obtido o exudato, como observado no efeito sobre o crescimento celular descrito anteriormente. A relação “dose-dependente” com a concentração de células de *Monoraphidium* sugere que o efeito observado pode ser causado pela própria cepa MORF-01.

Na literatura, a indução de clorose têm sido associada à deficiência nutricional, e funcionaria como mecanismo de adaptação para sobrevivência em condições de estresse (Sauer *et al.*, 1999). Como o meio com exudato foi reconstituído com nutrientes, esse efeito observado nos experimentos não se deve à deficiência nutricional. Entretanto, resultado de clorose semelhante foi obtido por Dagnino *et al.* (2006), quando trataram culturas de *Microcystis* com meio condicionado por ela própria observaram inibição de crescimento acompanhada de redução no conteúdo de clorofila.

A comunicação entre células através de sinalizadores com a finalidade de coordenar processos numa população é bem caracterizada em bactérias. Entretanto, já foi mostrado que clorofíceas podem produzir e secretar substâncias que mimetizam moléculas sinalizadoras utilizadas por bactérias no processo de *quorum sensing* (Teplitski *et al.*, 2004). Assim, vale investigar se ocorre uma comunicação intra-específica, e para isso seria preciso analisar o efeito do exudato de cultura monoespecífica da MORF-01 sobre ela mesma.

Uma outra hipótese seria que o cultivo misto estaria realmente favorecendo a produção de algum infoquímico. Este poderia ser produzido pela *Microcystis* MIRF-01, em função do aumento da densidade de *Monoraphidium* MORF-01, na tentativa de inibir o seu competidor. Entretanto, as culturas de MIRF-01 crescidas na presença do exudato do CM C sofreram maior efeito inibitório no 2º dia, embora não significativo, mas depois da recuperação (retomada do crescimento) alcançaram o maior rendimento no 6º dia (fig. 33b). Dessa forma, somente com esses experimentos não é possível esclarecer o papel dos produtos excretados a partir de cultivos mistos, em que predominam as células de *Monoraphidium*.

Os exudatos dos cultivos mistos não influenciaram significativamente a variação de clorofila a na cepa de *Microcystis* MIRF-01, como mostra a figura 35. Porém, apesar dos desvios altos, nota-se que no 2º dia houve um pequeno aumento na concentração clorofila a nas três condições. A partir do 4º dia, a concentração tende a diminuir, estabilizando próximo ao controle no 12º dia. Entretanto, neste experimento os cultivos foram realizados apenas com exudatos na concentração de 50%. No experimento anterior, os resultados mais distintos foram obtidos com exudatos na concentração de 100%. Mesmo assim, não foi verificada uma resposta diferenciada em relação à concentração de clorofila a por *Microcystis* para cada exudato, como ocorrido na situação anterior com *Monoraphidium*.

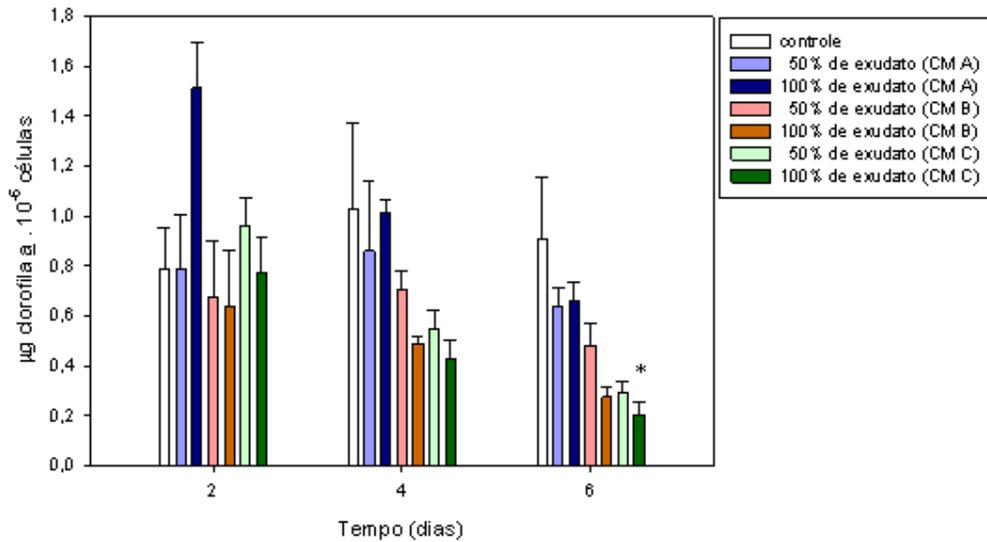


Fig. 34 - Efeito de duas concentrações (50 e 100%) dos exudatos de três cultivos mistos (de seis dias) distintos na concentração de clorofila a de *Monoraphidium MORF-01*. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão. O * indica que o valor é significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle.

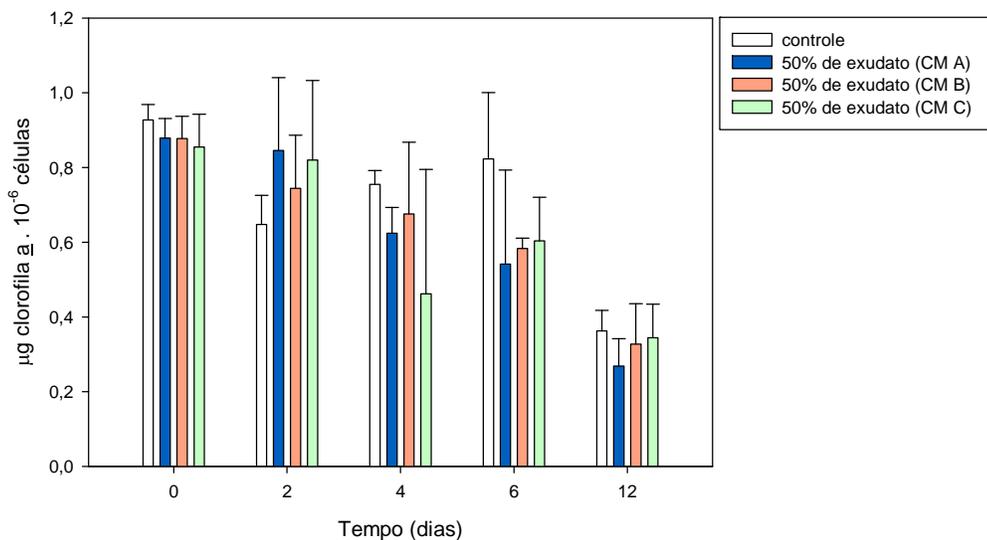


Fig. 35 - Efeito dos exudatos (concentração de 50%) de três cultivos mistos (de seis dias) distintos na concentração de clorofila a de *Microcystis MIRF-01*. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

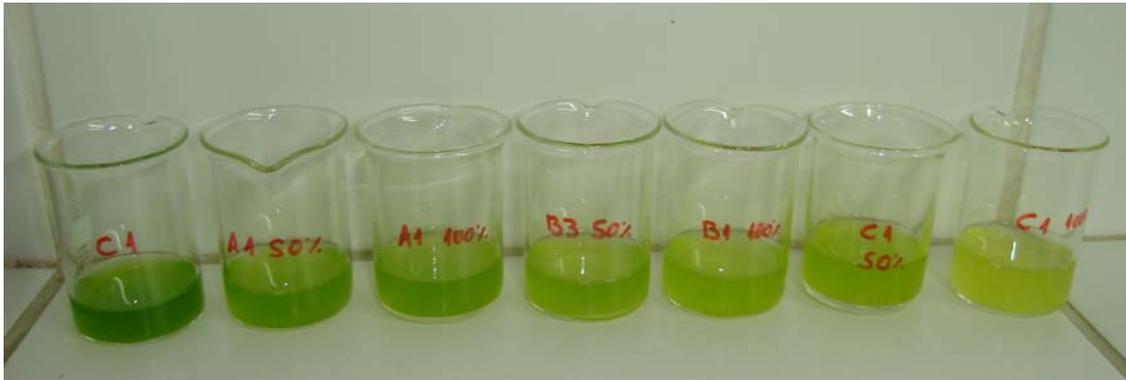


Fig. 36 – Aparência das culturas no 6º dia de crescimento após adição dos exudatos de cultivos mistos. A diferença na pigmentação é devido à variação na concentração de clorofila *a* de *Monoraphidium* MORF-01 (Fig. 34). A cepa foi cultivada em duas concentrações diferentes (50 e 100%) dos exudatos de três cultivos mistos (de seis dias) distintos. Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C).

4.7 Produção de microcistina pela cepa de *Microcystis* MIRF-01 em diferentes condições de cultivo

4.7.1 Na presença do exudato de *Monoraphidium* (MORF-01)

O cultivo de *Microcystis* (MIRF-01) com exudatos de *Monoraphidium* (MORF-01) em diferentes concentrações (5, 10 e 50%) levou a um aumento do conteúdo intracelular de microcistinas no 12º dia. Utilizando-se exudato na concentração de 50% foi observado um aumento de 120% de microcistinas em 10^6 células, em relação à condição controle. Como mostra a figura 37, este efeito foi independente da concentração, mas significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle somente na presença de 50% do exudato.

Produtos excretados por clorofíceas já demonstraram influência na produção de microcistinas (Kearns e Hunter, 2000), mas o efeito foi inibitório e não estimulou a produção como no presente estudo. Um outro estudo (Vardi *et al.*, 2002) mostrou que uma espécie de dinoflagelado pode induzir aumento da produção de microcistinas, em concordância com os nossos resultados apresentados.

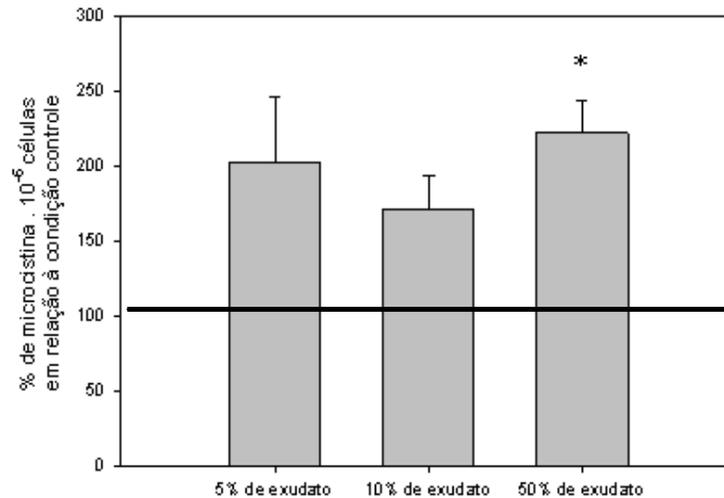


Fig. 37 - Efeito de três concentrações diferentes (5, 10 e 50%) do exudato de *Monoraphidium* MORF-01 na concentração intracelular de *Microcystis* cepa MIRF-01 no 12º dia de experimento. Os valores estão representados como a porcentagem em relação ao controle (100%). Os resultados representam a média (n=4) ± desvio padrão. O * indica que o valor é significativo (p<0,05) em relação ao controle.

4.7.2 Em cultivo misto com *Monoraphidium* (MORF-01)

Em cultivo misto com *Monoraphidium* MORF-01, realizado na proporção celular de 1:1, a produção de microcistinas por *Microcystis* MIRF-01 não foi alterada significativamente, embora a figura 38 mostre uma redução da porcentagem de microcistinas em 10⁶ células, em relação à condição controle. A presença da cepa de *Monoraphidium* não induziu aumento da concentração de toxina, como ocorreu na presença do seu exudato. Entretanto, a determinação da concentração de toxina foi feita no 6º dia, enquanto no caso do exudato foi realizada no 12º dia. Assim esse efeito pode ser notado mais tardiamente e não na fase exponencial.

Além disso, o cultivo misto foi realizado somente na proporção de 1:1. Cultivos com uma proporção maior da cepa MORF-01, poderiam induzir um aumento na produção de microcistinas, como observado por Oliveira (1997).

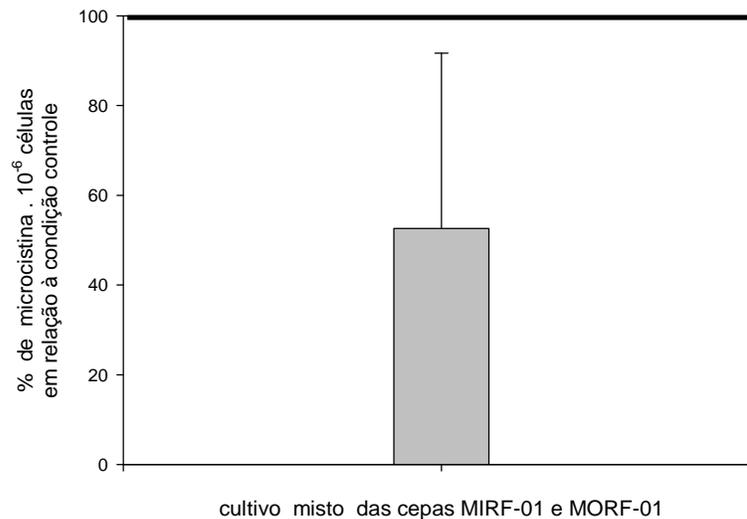


Fig. 38 - Concentração intracelular de microcistina de *Microcystis* MIRF-01 em cultivo misto com a cepa de *Monoraphidium* MORF-01 (proporção inicial de 1:1) no 6º dia de experimento. Os valores de % de microcistina estão representados em relação à condição controle (100%). O resultado representa a média (n=3) ± desvio padrão.

4.7.3 Na presença de exudatos de cultivos mistos

O cultivo de *Microcystis* (MIRF-01) com exudatos na concentração de 50% provenientes dos três cultivos mistos (CM A, CM B e CM C) não alterou a produção de microcistinas no 4º (fase exponencial) dia de crescimento (fig. 39). No entanto, no 12º dia (fase entre final da exponencial e início da estacionária) o efeito dos exudatos dos cultivos mistos foi dependente da porcentagem de células da cepa MORF-01 no cultivo misto, como mostra a figura 40. Nos cultivos A, B e C, o inóculo inicial de *Monoraphidium* era de 20, 50 e 70%, respectivamente. Foi verificado um aumento de 47%, não significativo, de microcistinas em 10⁶ células em relação à condição controle na presença do CM C (fig. 40). Este resultado confirma o aumento na produção de toxina induzido pelo exudato da cepa MORF-01, também detectado no 12º dia (fig. 37). Provavelmente, como o exudato utilizado no experimento anterior foi obtido de uma cultura do final da fase exponencial, essa tinha

mais células do que a condição do exudato do cultivo misto obtido do 6º dia. Assim, a indução no experimento foi um pouco maior.

Como já visto em diversos trabalhos, as microcistinas podem afetar o crescimento de organismos foto-autotróficos (Babica *et al.*, 2006, 2007; Kearns e Hunter, 2001), o que caracteriza uma vantagem competitiva para os produtores. Esta é uma das possíveis funções atribuída às microcistinas. Assim, a indução da toxina estaria relacionada ao efeito sobre o competidor. Entretanto, as microcistinas também podem induzir proliferação de algas coexistentes (Sedmak e Kosi, 1998), mostrando que essa toxina pode funcionar como um infoquímico e induzir respostas distintas dependendo da espécie alvo. Como já comentado anteriormente, no presente trabalho, seria interessante testar a resposta de *Monoraphidium* MORF-01 às microcistinas purificadas para investigar esta hipótese de indução do crescimento por efeito da toxina.

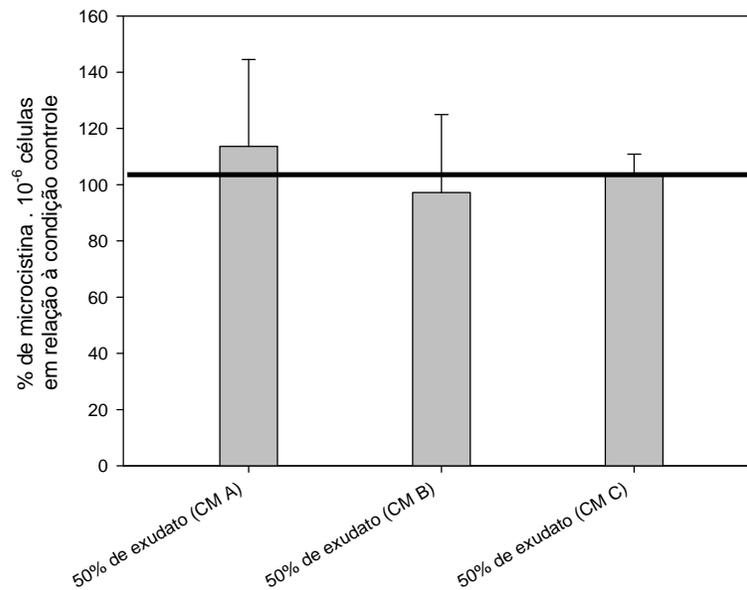


Fig. 39 - Efeito de exudatos na concentração de 50% de de três cultivos mistos (de seis dias) distintos na concentração intracelular de microcistina de *Microcystis* MIRF-01 no 4º dia de experimento. Os valores de % de microcistina estão representados em relação à condição controle (100%). Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

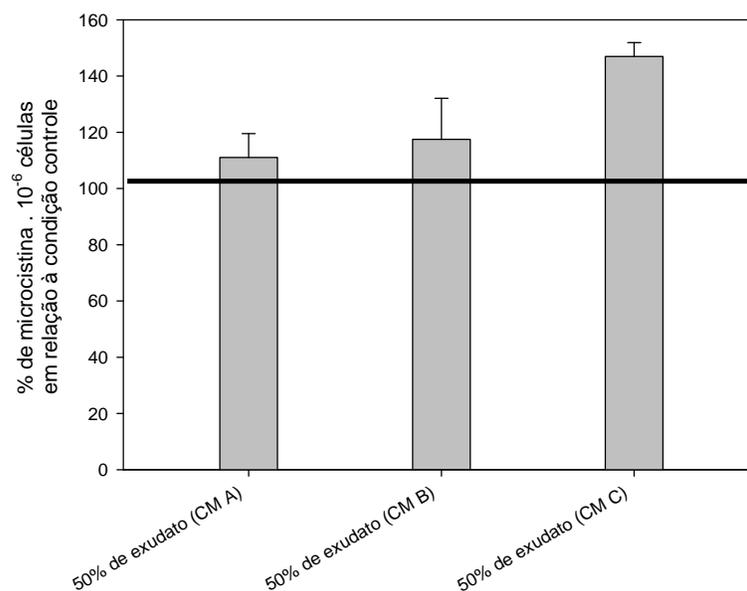


Fig. 40 - Efeito de exudatos na concentração de 50% de três cultivos mistos (de seis dias) distintos na concentração intracelular de microcistina de *Microcystis* MIRF-01 no 12º dia de experimento. Os valores de % de microcistina estão representados em relação à condição controle (100%). Para obtenção dos cultivos mistos foram inoculados: 80% de MIRF-01 e 20% de MORF-01 (CM A), 50% de MIRF-01 e 50% de MORF-01 (CM B), e 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01 (CM C). Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

5 DISCUSSÃO GERAL

Os dados apresentados nesse trabalho mostraram que a cepa de *Microcystis* cf. *aeruginosa* MIRF-01 parece não ter efeitos inibitórios sobre o crescimento da cepa de *Monoraphidium contortum* MORF-01. Tendo em vista que as cianobactérias constituem mais de 90% da biomassa fitoplanctônica do local de onde as cepas foram isoladas, a produção de aleloquímicos e até mesmo as toxinas poderiam contribuir de forma vantajosa contra os competidores. Entretanto, as cepas dessas duas espécies isoladas desse mesmo local parecem não sofrer efeitos inibitórios por seus respectivos exudatos, o que indica que pode ter ocorrido coexistência adaptativa. Contudo, sabe-se que as interações entre os organismos fotossintetizantes através da matéria orgânica excretada são cercadas de variáveis. A abordagem experimental pode influenciar os resultados, como foi demonstrado alterando-se a condição de aeração num dos experimentos, o que revelou que a clorofícea pode até se beneficiar do exudato da *Microcystis* (especialmente aquela de mesma origem). Além do mais, a partir de experimentos com apenas duas cepas não se pode generalizar que as espécies de *M. contortum* e *M. cf. aeruginosa* desse mesmo ambiente já tenham se adaptado aos seus respectivos produtos excretados. A utilização de uma cepa de *Microcystis* não tóxica isolada de um ambiente diferente também não mostrou efeitos inibitórios sobre essa cepa de *M. contortum*.

Outro aspecto interessante é que essa clorofícea é capaz de crescer na presença de uma cepa tóxica. A coexistência com cepas tóxicas é explicada na literatura em parte pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência aos efeitos danosos das toxinas (Mohamed, 2008). Algumas espécies de clorofíceas, inclusive do gênero *Monoraphidium*, podem coexistir com espécies formadoras de floração e até terem seu crescimento estimulado na presença da microcistina (Sedmak e Kosi, 1998). No entanto, os dados de cultivos mistos demonstraram haver uma limitação do crescimento de ambas as espécies, que não deve ser

apenas decorrente da competição por nutrientes. Isso gera questões para serem exploradas (disputa por luz e quantidade do inóculo utilizado) em experimentos futuros para buscar os fatores responsáveis pelo menor crescimento. Já a utilização de meios com exudatos de cultivos mistos mostrou uma tendência inibitória não observada anteriormente com o meio com exudato de culturas monoespecíficas. Isso demonstra que a qualidade de matéria orgânica excretada pode ser influenciada pela presença da outra espécie competidora e/ou também pela fase de cultivo.

Por outro lado, a verificação do efeito inibitório da matéria orgânica excretada mais pronunciado nas condições onde predominava a própria espécie, levanta um outro ponto importante que é a auto-inibição. A comunicação célula a célula é uma atividade importante para diversos tipos celulares. Bactérias utilizam o mecanismo de *quorum sensing* para monitorar sua densidade populacional por meio de sinalizadores extracelulares. Esse mecanismo pode regular a entrada na fase estacionária, quando sinais de condições desfavoráveis aparecem, como a depleção de nutrientes no meio. Esses sinalizadores acumulam no meio conforme o crescimento e desempenham um papel importante na fisiologia desses organismos, levando à redução do crescimento populacional (Lazazzera, 2000). Assim, os dados obtidos demonstram que a produção de infoquímicos por espécies fitoplanctônicas não seria apenas associado a mecanismos de controle de competição inter-específica, mas pode também ser uma ferramenta para o controle do tamanho da população.

Além disso, nossos dados demonstram, ainda que preliminarmente, que a matéria orgânica excretada pela clorofícea teria um efeito estimulador para a produção de microcistinas pela cepa de *Microcystis* isolada do mesmo ambiente. Isso sugere que a produção dessa cianotoxina no ambiente poderia ser estimulada pela presença de um competidor por recursos. Entretanto, não se pode verificar se essa toxina “*per se*” acarrete

algum efeito direto sobre a cloroficea. Alguns estudos já demonstraram interações recíprocas através de exudatos entre organismos fitoplanctônicos (Kearns e Hunter, 2000; Oliveira, 1997, Vardi *et al.*, 2002). Nessas interações foi mostrado que a espécie capaz de afetar a produção de toxina de uma outra espécie, também sofria influência no crescimento, atribuída à toxina ou a outro produto orgânico excretado. Já no presente estudo, o exudato de culturas monoespecíficas de *Microcystis* não apresentou influência negativa no crescimento da cloroficea (MORF-01), cujo exudato monoespecífico estimulou a produção de microcistina pela *Microcystis* (MIRF-01). Dessa forma, maiores investigações são necessárias para entender o papel da microcistina na interação entre essas duas cepas utilizadas.

Algumas considerações são importantes quando essas espécies estão expostas às condições ambientais. Além das características individuais das cepas, diferentes fatores, bem como a interação com os demais organismos aquáticos ajudam a compreender o sucesso de uma dada espécie em detrimento de outra. Mostra-se a complexidade dessa interação que pode ser variável conforme o tempo de exposição aos produtos excretados, dependendo da estabilidade desses produtos ou da própria recuperação do organismo, e também pela interação com outros fatores físicos (luz, temperatura), químicos (nutrientes), físico-químicos (pH) e mesmo biológicos (densidade da outra espécie). Cada um desses fatores, e também a atuação sinérgica desses pode influenciar a qualidade e quantidade de matéria orgânica excretada e a comunicação entre esses organismos.

Assim, todos esses dados (resumidos na tabela 8) nos permitem afirmar que a produção de matéria orgânica excretada por esses grupos de organismos fitoplanctônicos tem papel controlador sobre o metabolismo dessas espécies. Dessa forma, juntamente com o suporte de outros estudos afins (Kearns e Hunter, 2000, 2001; Mohamed, 2008; Oliveira, 1997, Vardi *et al.*, 2002) encontrados na literatura, pode-se indicar que parte da matéria orgânica excretada tem uma possível finalidade, e não seria apenas excretas resultantes do metabolismo. Além

disso, a produção desses compostos mostra-se variável em função da condição de crescimento desses organismos e também é possivelmente infra-específica. Portanto, acreditamos que essas questões levantam a importância de novas investigações sobre esse tema ainda tão pouco conhecido.

Tabela 8 – Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de interação entre *Monoraphidium* e *Microcystis*

Experimentos	Taxa de crescimento (μ)	Rendimento celular (R)	clorofila	microcistina
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01)	10% exudato MIRF-01 = Reduziu* outros = NS	NS	NS	–
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de <i>Microcystis</i> (MIRF-01, MILJ-04 ou MILJ-48)	50% exudato MIRF-01 = Aumentou** outros = Aumentaram NS	50% exudato MIRF-01 = Aumentou** outros = Aumentaram NS	50% exudato MIRF-01 = Reduziu* outros = NS	–
<i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) + exudato de <i>Monoraphidium</i> (MORF-01)	10% exudato = Aumentou** (MICD-01) outros = NS	outros = NS	outros = NS	50% exudato = Aumentou* ^c (MIRF-01) outros = Aumentaram NS
Cultivo misto de <i>Microcystis</i> (MIRF-01 ou MICD-01) + <i>Monoraphidium</i> (MORF-01)	Reduziu (NS) (MIRF-01, MICD-01 e MORF-01)	Reduziu (NS) (MIRF-01, MICD-01 e MORF-01)	–	Reduziu ^b (NS) (MIRF-01)
<i>Monoraphidium</i> (MORF-01) + exudato de cultivos mistos (MIRF-01 e MORF-01) 1 Obs. ^a	NS	NS	100% exudato CM C = Reduziu* ^{a,b} outros = NS	–
<i>Microcystis</i> (MIRF-01) + exudato de cultivos mistos (MIRF-01 e MORF-01) 2 Obs.	NS	NS	NS	50% exudatos = Aumentou ^{a,c} (NS) (MIRF-01)

Cultivo misto (CM) C = inóculo inicial de 30% de MIRF-01 e 70% de MORF-01; NS = parâmetro não foi alterado de forma significativa em relação ao controle; * = (p<0,05); ** = (p<0,01); a = Efeito do CM = CMC > CMB > CMA; b = no 6º dia ; c = no 12º dia; 1 Obs. = Foi verificada inibição do n.º de células/mL (NS) na presença de 100% do exudato dos cultivos mistos; 2 Obs. = Foi verificada inibição do n.º de células/mL (NS) na presença de 50% do exudato dos cultivos mistos.

6 CONCLUSÕES

1) As cepas de *Monoraphidium contortum* e de *Microcystis*. cf. *aeruginosa* isoladas do mesmo local parecem não sofrer efeitos inibitórios por seus respectivos exudatos nas condições experimentais testadas. Isso sugere que tenha sido desenvolvida uma coexistência adaptativa entre essas duas cepas, enquanto que com a utilização de meios com exudatos de cultivos mistos mostrou-se uma tendência inibitória e redução na concentração de clorofila a da cepa de *M. contortum*. Assim, a qualidade de matéria orgânica excretada pode ser influenciada pela presença da outra espécie competidora e/ou também pela fase de cultivo, além de apresentar efeitos variáveis de acordo com o tempo de exposição ao exudato.

2) A cepa de *M. contortum* é capaz de crescer melhor na presença da cepa tóxica do que na presença de uma cepa não tóxica de *Microcystis*. Entretanto, ambas as espécies demonstraram uma limitação do crescimento em cultivos mistos, que não deve ser apenas decorrente da competição por nutrientes. Isso revela a complexidade dessa interação, que ainda deve sofrer influências de outros fatores quando exposta às condições ambientais.

3) Os resultados demonstram que a matéria orgânica excretada pela clorofícea teria um efeito estimulador para a produção de microcistinas pela cepa de *Microcystis* isolada do mesmo ambiente. Embora o papel das microcistinas nesta interação ainda não esteja claro, pode-se sugerir que esse produto excretado pelo competidor tenha um papel sinalizador para a produção dessa cianotoxina.

4) Os dados obtidos com exudato de cultivos mistos sobre a cepa de *M. contortum* demonstram que a produção de infoquímicos por espécies fitoplanctônicas não seria apenas associada a mecanismos de controle de competição inter-específica, mas pode também ser uma ferramenta para o controle da densidade populacional.

5) Pode-se concluir que a produção de matéria orgânica excretada por esses grupos de organismos fitoplanctônicos tem papel controlador sobre o metabolismo dessas espécies, e mostra-se variável em função da condição de crescimento desses organismos e também é possivelmente infra-específica.

7 REFERÊNCIAS

APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C., American Public Health Association, 19th ed., Inc.: 10.18-10.19.

BABICA, P., BLÁHA, L. & MARSÁLEK, B. 2006. Exploring the role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. Journal of Phycology, 42: 9-20.

BABICA, P., HILSCEROVÁ, K., BARTOVÁ, K., BLÁHA, L. & MARŠÁLEK, B. 2007. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. Phycologia, 46(2): 137-142.

BARCO, B., LAWTON, L.A., RIVERA, J. & CAIXACH, J. 2005. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 1074 (1-2): 23-30.

BARNARD, A.M.L & SALMOND, G.P.C. 2004. Quorum Sensing: The Complexities of Chemical Communication between Bacteria. Complexus, 2: 87-101.

BEGON M., HARPER, J. L. & TOWNSEND, C. R. 1995. Ecology: Individuals, Populations and Communities. Blackwell Science. Victoria, Austrália, 2nd ed.

BLOMQUIST, P., PETTERSSON, A. & HYENSTRAND, P. 1994. Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems. Archiv für Hydrobiologie, 132: 141-164.

BRÖNMARK, C. & HANSSON, L. 2000. Chemical communication in aquatic systems: an introduction. OIKOS, 88: 103-109.

CARMICHAEL, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, 72: 445-459.

CARMICHAEL, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. Scientific American, 270: 78-86.

CODD, G.A., MORRINSON, L.F. & METCALF, S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicology and Applied Pharmacology, 203: 261-72.

CHRISTOFFERSEN, K. 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. Phycologia, 35 (6): 42-50.

DAGNINO, D., MEIRELES, D.A. & ALMEIDA, J.C.A. Growth of nutrient-replete *Microcystis* PCC 7806 cultures is inhibited by an extracellular signal produced by chlorotic cultures. Environmental Microbiology, 8(1): 30-36.

DAWSON, R.M. 1998. The Toxicology of Microcystins. Toxicon, 36 (7): 953-962.

DOMINGOS, P. 2001. Dominância de cianobactérias produtoras de microcistinas na lagoa de Jacarepaguá (RJ). Tese de Doutorado. Biotecnologia Vegetal, CCS, UFRJ.

DUY, T.N., LAM, P.K.S., SHAW, G.R. & CONNELL, D.W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algal) toxins in water. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology, 163: 115-136.

FEEMA - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. 1992. Qualidade das águas do estado do Rio de Janeiro: Bacia hidrográfica do Rio Guandu, Reservatório do Funil, Santana, vigário e Lajes, 1987/1989. FEEMA/DEP, Rio de Janeiro, v.2.

FIGUEREDO, C.C., GIANI, A. & BIRD, D.F. 2007. Does Allelopathy Contribute To *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Cyanobacteria) Bloom Occurrence And Geographic Expansion? Journal of Phycology, 43 (2): 256-265.

FOOG, G.E. & THAKE. 1987. Algae cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, Ltd., London. 3rd Ed.:26.

GANTAR, M., BERRY, J.P., THOMAS, S., WANG, M., PEREZ, R. & REIN, K.S. 2008. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. FEMS Microbiology Ecology, 64(1): 55-64.

GLEASON, F.K. & PAULSON, J.L. 1986. Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green algae *Synechococcus* sp. Archives of Microbiology, 138: 273-277.

GORHAN, P.R., MACLACHLAV, J.R., HAMMER, V.T. & KIM, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. Verh. Int. Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 15: 796-804.

- HAPPEY-HOOD, C.M.. 1988. Ecology of freshwater green algae In: SANDGREN, C.D. (ED), Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: 175-227.
- HU, Z.Q., LIU, Y.D. & LI, D.H. 2004. Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Environmental toxicology, 19(6): 571-577.
- JAISWAL, P., SINGH, P.K & PRASANNA, R. 2008. Cyanobacterial bioactive molecules--an overview of their toxic properties. Canadian journal of microbiology, 54(9): 701-17.
- JANG, M-H., HA, K., LUCAS, M.C., JOO, G.J. & TAKAMURA, N. 2004. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. Aquatic Toxicology, 68(1): 51-59.
- JANG, M-H, HA, K. & TAKAMURAC, N. 2008. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. Toxicon, 51(5): 882-889.
- JIA, X-H., SHI, D-J., KANG, R-J., LI, H-M., LIU, Y., AN, Z-Z., WANG, S-S., SONG, D-H. & DU, G-S. 2008. Allelopathic Inhibition by *Scenedesmus obliquus* of Photosynthesis and Growth of *Microcystis aeruginosa* In: Perception of the Environment and Signalling Photosynthesis; Energy from the Sun 14th International Congress on Photosynthesis:1339-1342.
- KAEBERNICK, M & NEILAN, B.A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. FEMS Microbiology Ecology, 35 (1), 1-9.
- KAEBERNICK, M., NEILAN, B.A., BÖRNER, T. & DITTMANN, E. 2000. Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. Applied and Environmental Microbiology, 66 (8): 3387-3392.
- KEARNS, K.D. & HUNTER, M. 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. Environmental Microbiology, 2(3): 291-297.
- KEARNS, K.D. & HUNTER, M.D. 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces setting of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. Microbiology Ecology, 42 (1): 80-86.

KEATING, K.I. 1978. Blue-Green Algal Inhibition of Diatom Growth: Transition from Mesotrophic to Eutrophic Community Structure. Science, 199(4332): 971-973.

KLASCHKA, U. 2008. The infochemical effect-a new chapter in ecotoxicology. Environmental science and pollution research, 15: 452-462.

LAZAZZERA, B.A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary Phase. Current Opinion in Microbiology, 3: 177-182.

LEFLAIVE, J. & TEN-HAGE, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biology, 52 (2), 199-214.

LEGRAND, C., RENGEFORS, K., FISTAROL, G.O. & GRANALI, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton: biochemical, ecological and evolutionary aspects. Phycologia, 42 (4): 406-419.

MARINHO, M.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2007. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Mycrocystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. Aquatic Ecology, 41: 525-533.

METCALF, J.S., MERILUOTO, J.A.O. & CODD, G.A., 2006. Legal and security requirements for the air transportation of cyanotoxins and toxicogenic cyanobacterial cells for legitimate research and analytical purposes. Toxicology letters, 163: 85-90.

MOHAMED, Z.A. 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. Ecotoxicology, 17(6): 504-516.

OH, H-M, LEE, S.J., JANG, M-H & YOON, B-D. 2000. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. Applied and Environmental Microbiology, 66 (1): 176-179.

OLIVEIRA, A.C.P. 1997. Estudo ecofisiológico de *Synechocystis aquatilis f. aquatilis* (Cyanophyceae) e produção de microcistina em cultivos unialgais e mistos. Dissertação de Mestrado. Biotecnologia Vegetal, CCS, UFRJ.

- PAERL, H.W. 1988. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) In: SANDGREN, C.D. (ED), Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: 261-315.
- PEARSON, L.A., HISBERGUES, M., BÖRNER, T., DITTMANN, E. & NEILAN, B.A. 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Applied and environmental microbiology, 70(11): 6370-6378.
- RAPALA, J., SIVONEN, K., LYRA, C. & NIEMELÄ, S.I. 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. Applied and environmental microbiology, 63(6): 2206-12.
- REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. & GONZÁLEZ, L. 1999. Ecophysiological Approach in Allelopathy. Critical Reviews in Plant Sciences, 18(5): 577-608.
- RENGEFORS, K. & LEGRAND, C. 2001. Toxicity in *Peridinium aciculiferum* - an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? Limnology and Oceanography, 46(8): 1990-1997.
- REYNOLDS, C. S. 1987. What is phytoplankton; Cyanobacterial water-blooms. In: J. Callow (ed.) Advances in botanical research. Academic Press., London: 1-30; 67-143.
- REYNOLDS C.S. 1999. Non-determinism to probability, or N : P in the community ecology of phytoplankton : Nutrient ratios. Archiv für Hydrobiologie, 146(1): 23-35.
- REYNOLDS, C. S. 2006. The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation). Cambridge University Press, Cambridge: 189-216.
- ROCHA, M.I.A. 2007. Estudo da variação sazonal do fitoplâncton e zooplâncton e da concentração de microcistinas nesses dois níveis tróficos no reservatório do funil (Resende-RJ). Dissertação de Mestrado. IBCCF°, CCS, UFRJ.
- ROMERO, M., DIGGLE, S. P., HEEB, S., CÁMARA, M. & OTERO, A. 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Microbiology Letters, 280(1): 73-80.
- SANT'ANA, C.L. & AZEVEDO, M.T.P. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. Nova Hedwigia, 71: 359-385.

SAUER, J., GÖRL, M. & FORCHHAMMER, K. 1999. Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. Archives of Microbiology, 172: 247-255.

SHARIF D.I., GALLON J., SMITH C.J. & DUDLEY E. 2008. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothoece* PCC6909. The ISME Journal, doi:10.1038/ismej.2008.68. Disponível em: www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/abs/ismej200868a.html. Acesso em: 20 out. 2008.

SEDMAK, B. & ELERSEK, T. 2006. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. Microbial Ecology, 51(4): 508-515.

SEDMAK, B. & KOSI, G. 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. Journal of Plankton Research, 20 (4): 691-708.

SHAPIRO, J. 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. Verh. Int. ver. Limnol., 24: 38-54.

SMITH, V. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43: 148-153.

SMITH, G.D. & DOAN, N.T. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. Journal of Applied Phycology, 11: 337-344.

SOARES, M.C.S. 2008. Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: uma batalha pelágica. Tese de Doutorado. Botânica, Museu Nacional, UFRJ.

SOARES, R.M, YUAN, M., SERVAITES, J.C., DELGADO, A., MAGALHÃES, V.F., HILBORN, E.D., CARMICHAEL, W.W. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2005. Sublethal Exposure from Microcystins to Renal Insufficiency Patients in Rio de Janeiro, Brazil. Environmental Toxicology, 21: 95-103.

SONG, L., SANO, T., LI, R., WATANABE, M.M, LIU,Y. & KAYA, K. 2006. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycological Research, 46(2): 19-23.

SPOOF, L.M, VESTERKVIST, P., LINDHOLM, T, & MERILUOTO, J. 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. The Journal of Chromatography A, 1020: 105-19.

SUIKKANEN, S., FISTAROL, G.O. & GRANÉLI, E. 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumdigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 308(1): 85-101.

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, 28 (6): 543-550.

TEPLITSKI, M., CHEN, H., RAJAMANI, S., GAO, M., MERIGHI, M., SAYRE, R.T., ROBINSON, J.B., ROLFE, B.G. & BAUER, W.D. 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* Secretes Compounds That Mimic Bacterial Signals and Interfere with Quorum Sensing Regulation in Bacteria. Plant Physiology, 134: 137-146.

TILLET, D., PARKER, D.L. & NEILAN, B.A. 2001. Detection of Toxicogenicity by a Probe for the Microcystin Synthetase A Gene (*mcyA*) of the Cyanobacterial Genus *Microcystis*: Comparison of Toxicities with 16S rRNA and Phycocyanin Operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) Phylogenies. Applied and Environmental Microbiology, 67 (6): 2810-2818.

VARDI, A., SCHATZ, D., BEERI, K., MOTRO U., SUKENIK A., LEVINE, A. & KAPLAN, A. 2002. Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. Current Biology, 12 (20): 1767-1772.

VON ELERT, E. & JUTTNER, F. 1996. Factors influencing the allelopathic activity of the planktonic cyanobacterium *Trichormus doliolum*. Phycologia, 35(6): 68-73.

WATANABE, M.F., HARADA, K-I, MATSUURA, K., WATANABE, M. & SUZUKI, M. 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). Journal of Applied Phycology, 1(2): 161-165.

WATANABE, M.F. & OISHI, S. 1983. A highly toxic strain of blue-green alga *Microcystis aeruginosa* isolated from Lake Suwa. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 49: 1759.

WATANABE, M.F. & OISHI, S. 1985. Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions. Applied and Environmental Microbiology, 49(5): 1342-1344.

WATERS, C. M. & BASSLER, B. 2005. Quorum sensing: Cell to cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21: 319-346.

WATSON, S.B., MACCAULEY, E. & DOWNING, J.A. 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. Limnology and Oceanography, 42: 487-495.

WELKER, M., MARSÁLEK, B., SEJNOHOVÁ, L. & VON DÖHREN H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. Peptides, 27(9): 2090-103.

WIEGAND, C. & PFLUGMACHER, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology, 203: 201-18.

WINDUST, A., QUILLIAM, M., WRIGHT, J. & MCLACHLAN, J. 1997. Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Toxicon, 35 (11), 1591-1603.