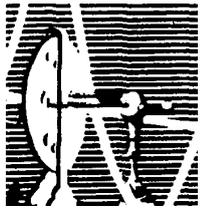




**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



Pedro Lima Sampaio

Interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do Reservatório do Funil, Resende (RJ).

**Rio de Janeiro
2011**

Pedro Lima Sampaio

**Interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e
Cylindrospermopsis raciborskii isoladas do
Reservatório do Funil, Resende (RJ).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do 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 Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2011**

Sampaio, Pedro Lima
Interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e
Cylindrospermopsis raciborskii isoladas do Reservatório do Funil, Resende (RJ) /
Pedro Lima Sampaio. Rio de Janeiro, 2011.
85 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica - Biofísica) Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2011.

Orientador: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo.

1. Alelopatia. 2. Florações. 3. Cianobactérias. 4. *Cylindrospermopsis raciborskii*
5. *Microcystis aeruginosa*. 6. Fitoplâncton.
I. Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira e (Orient.). II. Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Interações
alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*
isoladas do Reservatório do Funil, Resende (RJ).

Pedro Lima Sampaio

Interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do Reservatório do Funil, Resende (RJ).

Rio de Janeiro, de de 2011

Aprovada por:

PROF.

PROF.

PROF.

PROF.

PROF.

PROF.

Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo / IBCCF^o
(Orientadora)

O senhor vê: existe cachoeira; e pois? Mas cachoeira é barranco de chão, e água caindo por ele, retombando; o senhor consome essa água, ou desfaz o barranco, sobra cachoeira alguma? Viver é negócio muito perigoso...

João Guimarães Rosa

G. Serão: Veredas (2001, p.26)

AGRADECIMENTOS

A memória é uma boa, mas não infalível estratégia de reconhecimento e resgate daqueles que nos acompanham no tempo, mesmo estando distante. As palavras de agradecimento que aqui se materializam são resultado de um exercício de reflexão sobre esses anos de mestrado e, como toda retrospectiva, é imprecisa e fragmentada. Sinto-me redimido pela certeza de que todos aos que importa sabem muito bem sua devida importância na construção de minha história pessoal e acadêmica.

Primeiramente, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa, permitindo-me despendar tempo e energia devidos a essa empreitada que, em primeira instância, é sempre pessoal.

Agradeço à Sandra Azevedo, pela irrestrita confiança e respeito quanto às minhas idéias e personalidade, apontando-me caminhos alternativos com a devida delicadeza. Não espero encontrar melhor maneira de me relacionar com aqueles com quem ainda tenho muito a aprender.

Agradeço especialmente ao meu companheiro próximo de trabalho, pela paciência em momentos de tensão e pela diversão do dia-a-dia. Valeu, Gustavo

Agradeço a todos os companheiros e amigos do LETC. Acima de tudo, é muito bom trabalhar com vocês: Adriana, Ana Cláudia, Ana Lúcia, Bárbara, Betinha, Carol, César, Daniel, Elisângela, Fernanda, Gustavo, Jamê, Isabel, Laís, Luana, Prí, Rafael,

Ramon, Raquel, Ricardinho, Roberta, Rodrigo, Ronaldo, Rosane, Simone, Thais, Valéria!

Agradeço à Elis e à Pri, pela prontidão com que estão dispostas a ajudar.

Agradeço (deve existir melhor palavra) à Dedéia pelo carinho e amizade, discussões acadêmicas e pessoais, forrós e sambas, aulas e pesquisas, dia e noite, vinhos e cervejas, bicicletas e caminhadas!

Agradeço à Carol, grande amiga com quem compartilhei o início e o fim de todo esse processo.

Agradeço à lamê, com quem compartilho um sentimento de já ter conhecido antes, pela familiaridade cotidiana.

Agradeço aos meus pais por exercerem tão bem o grande desafio que é a criação para o desprendimento.

Agradeço à minha irmã, Mariana, com quem cresci aprendendo a brincar.

Agradeço à “galerinha”, falar de vocês é contar minha história.

Agradeço à galera da eterna Fanfarra Paradiso: Braga, Daniel Daniel, Fernando, Paulinha, Rafael, Tati, Toy, Zamith e, é claro, ao eterno membro ausente, Eduardo!

Agradeço aos novos e indiscutíveis amigos do Jupará e o Rato Azul, pelos ensaios e encontros semanais: Biglíru, Fred e Pachá!

Agradeço àqueles que tiveram comigo durante a graduação, para os quais escolho alguns representantes: Tiago, Lázaro, Luciana, Pablo, Vitor, Flávia, Mauro

Agradeço à Laís, que durante todo o tempo foi a principal motivação de meu esforço para ingresso e concretização dessa etapa.

RESUMO

SAMPAIO, Pedro Lima. Interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do Reservatório do Funil, Resende (RJ). Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológicas/ Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O estabelecimento de interações alelopáticas em comunidades fitoplanctônicas, tem sido cada vez mais considerado um fator capaz de favorecer a formação de florações, por suprimir o crescimento de competidores em potencial. Estudos sobre esse tipo de interação já foram realizados no com cepas do Reservatório do Funil, Resende, RJ, sugerindo sua influência na alternância de dominância entre duas das principais espécies de cianobactérias no local: *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. O presente estudo utilizou-se de uma cepa de cada uma dessas duas espécies, MiRF-1 e CyRF-1, respectivamente, com o objetivo de contribuir para o conhecimento acerca da possível influência das interações alelopáticas sobre a dinâmica de florações no local. As cepas, isoladas do reservatório, foram utilizadas em experimentos que se basearam em cultivo cruzado. Primeiro, testou-se o efeito de diferentes proporções (10%, 20%, 50%) do material excretado por CyRF-1 sobre o cultivo de MiRF-1. Os resultados revelaram que o material excretado de CyRF-1 diminuiu rendimento de MiRF-1, quando presente na proporção de 50%, mas não afetou sua taxa de crescimento. As células de MiRF-1 nessa condição também apresentaram colônias maiores, sedimentação e maiores quantidades de carboidratos celulares. Não houve diferenças na produção de clorofila ou microcistinas por MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1. Em seguida, foi testado o efeito do material excretado de MiRF-1 sobre CyRF-1, porém este não teve qualquer efeito sobre o crescimento ou produção de clorofila-a de CyRF-1. entre controle e tratamentos. MiRF-1 não parece ser estimulada à produção de possíveis aleloquímicos por exposição prévia ao exsudato de CyRF-1, sob as condições testadas. Os resultados sugerem uma possível interação alelopática entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, que pode estar relacionada com a alternância de dominância entre as intensas florações ocorrentes no Reservatório do Funil e à separação de nicho entre as duas espécies no local.

ABSTRACT

SAMPAIO, Pedro Lima. Allelopathic interactions between *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Funil Reservoir, Resende (RJ). Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológicas/ Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Allelopathic interactions among phytoplankton microorganisms may play an important role in the establishment and maintenance of algae blooms, since they can suppress the growth of potential competitors, giving competitive advantage for the allelochemical producer. Evidence suggests that allelopathy influences the shifts in dominance between *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* blooms in an eutrophic reservoir from Rio de Janeiro, Brazil (Reservatório do Funil). The aim of this study is to further investigate this possibility. For this purpose one strain of each species, isolated from the reservoir, was used on “cross-culture” based experiments. First, a *Microcystis aeruginosa* strain (MiRF-1) was grown in ASM-1 enriched with different proportions (10%, 20% and 50%) of the exudate produced by a *Cylindrospermopsis raciborskii* strain (CyRF-1). The results showed an inhibition of MiRF-1 growth in terms of yield, only in the presence of 50% of CyRF-1 exudate. Growth rates were not affected. Bigger colony, intense sedimentation and cellular carbohydrate accumulation were also observed in MiRF-1 cells on this condition, but no effect on chlorophyll-*a* or microcystin content in MiRF-1 occurred. Then, the effect of MiRF-1 exudate on CyRF-1 (50% proportion in the medium), was also tested. However, CyRF-1 exudate did not affect MiRF-1, regarding growth or chlorophyll-*a*, under the conditions tested. In addition, no evidence was found that MiRF-1 produces an allelochemical in response to previous exposition to CyRF-1 exudate, under the conditions tested. The results suggest that a possible allelopathic interaction between *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* may influence on intense blooms and niche separation that takes place in Funil Reservoir.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS E HABILIDADES COMPETITIVAS	17
1.2. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS E HABILIDADES COMPETITIVAS	18
1.3. INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CIANOBACTÉRIAS E NO FITOPLÂNCTON EM GERAL	19
1.3.1. Definição e considerações importantes sobre alelopatia	19
1.3.2. Fatores capazes de influenciar nas interações alelopáticas	23
1.3.2.1. Fatores abióticos	24
1.3.2.2. Fatores bióticos	25
1.3.3. Cianotoxinas e alelopatia	27
1.4. CIANOPEPTÍDEOS NÃO TÓXICOS E ALELOPATIA	28
1.5. ALELOPATIA ENTRE <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> : O CASO DO RESERVATÓRIO DO FUNIL	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.CEPAS UTILIZADAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	32

3.2. PRODUÇÃO DE MEIO ASM-1 COM EXSUDATO PARA REALIZAÇÃO DE CULTIVOS CRUZADOS	33
3.3. DESENHOS EXPERIMENTAIS	34
3.3.1 Experimento I: Efeitos alelopáticos de diferentes diluições do material excretado por CyRF-1 (produtora) sobre MiRF-1 (alvo)	34
3.3.2 Experimento II: Efeitos alelopáticos do material excretado por MiRF-1 (produtora) sobre CyRF-1 (alvo)	36
3.4. ANÁLISES	39
3.4.1. Determinação da densidade celular para obtenção das curvas de crescimento	39
3.4.2. Determinação da concentração de clorofila-a	41
3.4.3. Determinação de pH	42
3.4.4. Extração e pré-purificação de cianopeptídeos	42
3.4.5. Análise de cianopeptídeos por Cromatografia Líquida em Alta Resolução	42
3.4.6. Quantificação de microcistinas extracelulares	43
3.4.7 Extração e determinação das concentrações de carboidratos	43
3.4.8. Análise estatística	44
3.5. RESUMO DOS EXPERIMENTOS	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. EXPERIMENTO I: EFEITOS ALELOPÁTICOS DE DIFERENTES DILUIÇÕES DO MATERIAL EXCRETADO POR CyRF-1 SOBRE MiRF-1 (ALVO)	47
4.2. EXPERIMENTO II: EFEITOS ALELOPÁTICOS DO MATERIAL EXCRETADO POR MiRF-1 (PRODUTORA) SOBRE CyRF-1 (ALVO)	65

4.3. UM POSSÍVEL CENÁRIO BASEADO NOS RESULTADOS ENCONTRADOS	70
5. CONCLUSÕES	72
6. PERSPECTIVAS	74
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos sobre o fitoplâncton abordam a descrição de fatores que influenciam na estrutura e composição de sua comunidade, preocupação que se justifica por esses organismos serem os principais produtores primários em diversos ambientes aquáticos, sustentando grande parte da cadeia trófica (Padisak, 2003). A grande diversidade do grupo, no entanto, dificulta o problema, exigindo uma abordagem múltipla que considere fatores bióticos e abióticos.

A comunidade fitoplanctônica é composta por organismos de classificação taxonômica bastante distinta, incluindo 2 domínios, 11 filos e, pelo menos, 33 ordens de micro-organismos fotossintetizantes (Reynolds, 2006). É de se esperar, portanto, uma heterogeneidade nas preferências e tolerâncias ambientais entre esses grupos, o que permite agrupá-los em classificações ecológicas de acordo com suas características adaptativas. Essas classificações polifiléticas facilitam em muito a compreensão acerca do favorecimento de certas espécies em determinadas comunidades, bem como da variação da composição fitoplanctônica no tempo e espaço, o que permite uma associação recíproca entre características ambientais e agrupamentos locais, aos moldes das associações fitosociológicas (Reynolds *et al.*, 2002; Crossetti *et al.*, 2005; Huszar *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2008).

Sob essa perspectiva, cianobactérias fazem parte de, pelo menos, 10 dos 31 agrupamentos funcionais caracterizados por Reynolds (2006), o que ilustra sua vasta amplitude ecológica. No entanto, são aqueles grupos tipicamente relacionados a ambientes eutrofizados e com altas temperaturas, que costumam receber a maior parte da atenção em pesquisa. Segundo Carmichael (1994), esses grupos de cianobactérias costumam apresentar maior adaptabilidade em águas neutro-

alcalinas (pH 6-9), com temperatura entre 15 e 30°C e alta concentração de nutrientes, caracterizando ambientes de água doce ricos principalmente em nitrogênio e fósforo como os mais propícios para seu crescimento. Sob essas condições, densidades massivas podem ser atingidas, ocasionando um alto grau de dominância na comunidade e caracterizando o fenômeno conhecido como florações de cianobactérias (Chorus & Bartram, 1999).

Florações de cianobactérias são em sua maioria nocivas por causarem danos ecológicos e por afetarem diretamente a saúde de populações humanas que se utilizam dos corpos d'água nos quais estão presentes (Paerl, 2011). Após atingirem altas biomassas, a morte das células é seguida por um intenso processo de decomposição aeróbica, criando condições anóxicas e acarretando a morte massiva de peixes no local. Soma-se a isso o fato de apresentarem baixo valor nutricional, comparado ao de outros grupos fitoplanctônicos e de representarem alimentos de difícil ingestão e digestão para o zooplâncton, devido ao tamanho e formato de algumas espécies. Além disso, muitas espécies produzem compostos com efeitos danosos aos seus predadores, gerando consequências negativas para a cadeia trófica (Paerl & Fulton, 2006). Muitos desses compostos são tóxicos para seres humanos e outros organismos eucariontes, sendo classificados como cianotoxinas, moléculas de natureza química (ex: peptídeos, alcalóides) e efeitos tóxicos (ex: hepatotóxico, neurotóxico, citotóxico) diversos e que já protagonizaram casos de intoxicação severa em humanos (Azevedo *et al.*, 1997; Griffith & Saker, 2002).

Os vários danos ecológicos e ecotoxicológicos representam prejuízos econômicos e para a saúde pública, atuando como estímulo para que muitas pesquisas sejam

realizadas com a intenção de se entender as causas determinantes para ocorrência das florações de cianobactérias (Chorus & Bartram, 1999.).

No entanto, por serem diversos os fatores reguladores da comunidade fitoplanctônica, espera-se uma influência plural na ocorrência do fenômeno, sendo necessário levar em consideração não só a interação entre fatores químicos, físicos e bióticos (Paerl & Futton, 2006), mas também as características fisiológicas da própria espécie de cianobactéria presente no local. Isso ocorre porque os diferentes comportamentos ecofisiológicos na massa d'água favorecem o desenvolvimento massivo de grupos funcionais diferentes sob condições específicas (Dokulil & Teubner, 2000), o que é resultado da longa história evolutiva de um grupo que já se estabeleceu no planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos. Alta afinidade por Nitrogênio e fósforo e eficiência em sua utilização; absorção luxuriante, fixação de nitrogênio atmosférico, alta capacidade de regulação vertical na massa d'água, são exemplos de diversificações que garantem o sucesso competitivo de diferentes espécies de cianobactéria formadoras de florações, em relação a seus competidores. (Manzi & Azevedo, 2007 e Lips & Lips, 2008).

Recentemente, o estabelecimento de interações alelopáticas tem sido um aspecto cada vez mais considerado importante em conferir vantagens competitivas às cianobactérias. Acredita-se que esse tipo de competição por interferência possa participar na substituição de espécies fitoplanctônicas ao longo do ano ou mesmo facilitar a formação e manutenção de florações de cianobactérias (Keating, 1977; Figueiredo *et al.*, 2007; Oberhaus *et al.* 2008).

Muitas das características citadas estão presentes nas duas espécies de cianobactérias estudadas no presente trabalho: *Cylindrospermopsis raciborskii* e

Microcystis aeruginosa. Ambas são tóxicas e formadoras de florações nocivas em águas brasileiras e de todo o mundo, como descrito a seguir.

1.1. *Microcystis aeruginosa*: CARACTERÍSTICAS GERAIS E HABILIDADES COMPETITIVAS

Microcystis aeruginosa se apresenta na forma de colônias esféricas ou alongadas, constituídas por células mais ou menos esféricas e bainha de mucilagem indistinta (Komarek & Anagnostidis, 1999). O grande tamanho de suas colônias e a composição da mucilagem são considerados mecanismos de defesa contra predação, dificultando sua ingestão e digestão por predadores (Yang *et al.*, 2009). A espécie é potencial produtora de microcistinas, um grupo de cianopeptídeos hepatotóxicos capazes de inibir proteínas fosfatase 1 e 2A de organismos eucariotos.

Altas temperaturas parecem favorecer a frequente dominância e formação de florações pela espécie, que apresenta temperaturas ótimas para o crescimento entre 30°C e 35°C (Imai *et al.*, 2009). Dentre as características que conferem vantagens na competição por luz e nutrientes, a presença de aerótopos em *Microcystis aeruginosa* auxilia na migração vertical das células na camada d'água, conferindo especial vantagem em ambientes estratificados, nos quais existe a separação entre esses recursos (Wallace & Hamilton, 1999). Uma vez na presença de nutrientes, a alta afinidade por nitrogênio e fósforo, bem como a capacidade de absorção luxuriante dos mesmos são estratégias típicas de grandes competidoras e extremamente importantes para espécies de crescimento lento, beneficiadas pela estabilização do sistema.

Além destas características de competição por recursos, a competição por interferência, mediada por compostos alelopáticos, é objeto de investigação cada vez mais frequente como uma importante estratégia da espécie.

1.2. *Cylindrospermopsis raciborskii*: CARACTERÍSTICAS GERAIS E HABILIDADES COMPETITIVAS

Cylindrospermopsis raciborskii se apresenta na forma de filamentos isopolares de comprimento bastante variável. A espécie já foi relatada como potencial produtora de cilindrospermopsinas, um grupo de alcalóides citotóxicos, com atividade genotóxica e carcinogênica em organismos eucariontes (Padisak, 1997). Em 1979, esta cianotoxina foi considerada a responsável pelo adoecimento de mais de 100 crianças aborígenes, que desenvolveram um quadro de gastroenterite, denominado doença de “Palm Island” (Griffiths & Saker, 2002). No entanto, cepas da espécie isoladas de águas brasileiras nunca foram registradas como produtoras de nenhum tipo de cilindrospermopsina, mas sim de saxitoxinas, alcalóides neurotóxicos bastante comuns em ambientes marinhos, devido a sua produção por dinoflagelados (Lagos *et al.* 1999).

Considerada uma espécie tipicamente invasora, *C. raciborskii* teve sua dispersão e sequência evolutiva descrita de forma teórica por Padisak (1997). Dentre as várias características responsáveis pelo sucesso da ocupação global dessa espécie, a autora destaca algumas, como a alta capacidade de regulação da flutuabilidade, a tolerância ao sombreamento, a alta afinidade por nitrogênio em forma de amônia, a formação de células heterocíticas capazes de fixar nitrogênio atmosférico, a alta afinidade por fósforo, além da capacidade para estocá-lo e mobilizá-los de suas fontes internas. Por último, a resistência à herbivoria, uma consequência das formas alongadas de seus filamentos, também se faz importante.

Briand *et al* (2004) testaram a tolerância fisiológica de várias cepas da espécie cultivadas sob diferentes temperaturas e intensidades luminosas, sugerindo que a alta adaptabilidade, aliada a temperaturas globais crescentes, devem estar contribuindo para que sua distribuição tenha se ampliado nas últimas décadas.

Assim como ocorre para *Microcystis aeruginosa*, a alelopatia vem sendo considerada um importante fator de dominância de *C. raciborskii* e pode ter influência direta em sua capacidade invasiva.(Figueiredo, 2007)

1.3. INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CIANOBACTÉRIAS E NO FITOPLÂNCTON EM GERAL

São poucos os trabalhos disponíveis a respeito de alelopatia estabelecida entre cianobactérias. Portanto, as informações apresentadas a seguir incluem trabalhos que trataram do tema no fitoplâncton de modo geral, tanto marinho quanto de água doce. Deve ser considerado que os princípios gerais da alelopatia não diferem de forma drástica entre os diferentes ambientes aquáticos, respeitando suas particularidades (Gross, 2003).

1.3.1. Definição e considerações importantes sobre alelopatia

Na definição de Molisch (1937), *apud* Legrand *et al.* (2003), utilizada por muitos trabalhos que abordam a alelopatia em comunidades fitoplanctônicas, esta interação é definida como “todo tipo de interação bioquímica entre plantas superiores e entre plantas superiores e micro-organismos”. Portanto, a existência do emissor de um composto químico, capaz de afetar um organismo receptor é premissa básica para seu estabelecimento. Além disso, esse tipo de interação interespecífica deve ser capaz de conferir vantagens competitivas para um dos indivíduos envolvidos e, nesse sentido, existem divergências entre os autores. Enquanto alguns consideram

apenas os efeitos negativos à reprodução do receptor, outros incluem os efeitos positivos ao mesmo, na conta da alelopatia. (Legrand *et al.*, 2003; Fistarol *et al.*, 2004). Provavelmente essa divergência é consequência de interpretações evolutivas distintas para o estabelecimento da interação, ou até mesmo da ausência desse tipo de reflexão. Espera-se que um efeito inibitório do aleloquímico sobre o receptor seja característica adaptativa do organismo emissor, enquanto o contrário seja capaz de conferir seleção vantajosa ao próprio receptor.

A concepção que considera como alelopatia apenas as interações químicas causadoras de efeitos negativos para o receptor já rendeu a descrição de possíveis cenários evolutivos para seu estabelecimento. De acordo com esta visão, um cenário provável se configura a partir do momento em que compostos tóxicos são excretados inicialmente com o objetivo de evitar autotoxicidade, ou quando mecanismos de resistência a compostos tóxicos previamente excretados são desenvolvidos pelo produtor. Isso levaria a uma vantagem secundária para a célula produtora na medida em que o composto tóxico passasse a afetar seus competidores, mas não a própria célula produtora (Leflaive & Ten-Hage, 2007). De acordo com o modelo de Sinkkonen (2006), esse processo, inicialmente não direcionado à competição, pode vir a se tornar “intencional paralelo” (aleloquímico com múltiplas funções) ou “primário” (aleloquímico com função exclusiva), caso aumente o valor adaptativo do emissor por tempo o suficiente.

Por outro lado, não foi encontrado nenhum trabalho que desenvolvesse de modo semelhante um quadro teórico compatível com o estabelecimento das chamadas interações alelopáticas positivas. No entanto, a utilização ambígua do conceito não é contestada por Keating (1977), após verificar que o efeito de “filtrados celulares” de

cepas de diversas espécies fitoplanctônicas, isoladas do lago Linsley, Connecticut, era positivo ou neutro sobre espécies sucessoras na dinâmica da comunidade do lago e negativo sobre suas antecessoras. Mohamed (2002) também afirma que “a atividade alelopática de *Spirogyra sp.* estimula o crescimento e a produção de toxina por *Oscillatoria agardhii* e deve ser levada em consideração durante monitoramentos de florações de cianobactérias”.

De modo diferenciado, Lewis (1986) sugere o conceito de “alelopatia sinal”, explicando efeitos inibitórios como possível característica do receptor, que se utilizaria do sinal químico como uma maneira de “tatear” o nicho e estabelecer duas estratégias possíveis: 1) crescimento ou 2) reserva e manutenção. Com isso, o autor afirma ter encontrado uma possível solução para se contornar críticas frequentes, que afirmam não ser a alelopatia uma interação ecológica, evolutivamente estável, devido às questões de benefício distribuído e de incompetência adaptativa. Para as interações alelopáticas ditas positivas, esses argumentos não parecem ser um problema, tampouco o conceito de “alelopatia sinal” parece ser contraditório para as mesmas.

É importante perceber que as perspectivas apresentadas não são excludentes entre si. Apesar disso, fica evidente o risco de, na falta de contextualização evolutiva, estar se agrupando características adaptativas de origens evolutivas e consequências ecológicas bastante distintas. No entanto, poucos trabalhos realizam o exercício teórico necessário, restringindo suas conclusões a uma transposição direta dos resultados laboratoriais para o campo, sejam eles estimulatórios ou inibitórios. O presente trabalho se propõe a considerar todas as possíveis teorias já propostas, excludentes ou não, para interpretação dos resultados e entender por

qual das conceituações teóricas de alelopatia eles poderiam ser melhor compreendidos.

Legrand *et al.* (2003), reconhecem a importância de uma interpretação evolutiva em estudos sobre alelopatia. Os autores consideram apenas os efeitos negativos como alelopáticos, já que para eles “a interação evoluiu como uma característica própria do doador, conferindo vantagem seletiva a este ao reduzir a capacidade competitiva do organismo competidor”. O trabalho ainda avança nas exigências impostas aos estudos, transpondo para o fitoplâncton os seis critérios apresentados por Willis (1985), como pré-requisitos obrigatórios à demonstração desse tipo de interação em plantas terrestres. Esses critérios são: 1) Encontrar um padrão consistente de inibição de uma espécie alvo, 2) Identificar um composto tóxico, produzido pela espécie emissora para sua(s) Competidora(s), 3) Identificar um processo para emissão desse composto no ambiente, 4) Descrever um mecanismo de transporte ou acúmulo do composto no ambiente, 5) Identificar um mecanismo de absorção do composto pela célula alvo. Além disso, o padrão de inibição não deve ser explicado por nenhum fator físico ou qualquer outro fator biótico.

Não existem motivos para que os pressupostos de Willis (1985) não sejam válidos para estudos de atividades alelopáticas no fitoplâncton, como sugere Legrand *et al.* (2003), com exceção daquele que considera a necessidade de haver absorção do aleloquímico pela célula alvo (quinto pressuposto), já que é razoável esperar uma maior sensibilidade de organismos unicelulares por compostos que atuem sobre a membrana plasmática, ativando vias de sinalização ou afetando diretamente sua estrutura, excluindo a obrigatoriedade de haver um mecanismo de absorção pela célula alvo. Ma (2010) caracterizou o que ele considerou ser um aleloquímico

produzido pelo dinoflagelado *Alexandrium tamarensis*, com atividade lítica sobre diversos grupos fitoplanctônicos. Após extensos estudos, o autor concluiu que este “composto com atividade lítica causa ruptura direta da membrana, ao invés de induzir a via apoptótica por ativação por canais de Ca⁺” em modelo de linhagem celular PC12, estabelecida a partir de Feocromocitoma da medula adrenal de rato. Certamente esta é a descrição de uma interação alelopática que mais se adequa aos pressupostos de Willis (1985), atendendo a pelo menos quatro deles.

Notavelmente, o único pressuposto não contemplado no trabalho de Ma (2010), que diz respeito à difusão e acúmulo dos aleloquímicos no ambiente, é alvo das maiores críticas na área, sendo duas das questões mais difíceis de serem resolvidas para validação de resultados obtidos em laboratório. Como os compostos aleloquímicos se dispersam a partir da célula produtora, atingindo a célula alvo? Além disso, estes compostos são encontrados em concentrações suficientemente altas para que os efeitos observados em laboratório ocorram no ambiente? Uma estratégia capaz de amenizar tais críticas é trabalhar com doses e densidades celulares próximas daquelas encontradas no ambiente (Legrand *et al.*, 2003). Além disso, ao se considerar interações alelopáticas estabelecidas por florações como o objeto de estudo, trabalha-se com altas densidades celulares, esperando-se que esta corresponda a altas concentrações do aleloquímico no meio. Para isso é importante entender quais os fatores capazes de influenciar a produção dos aleloquímicos.

1.3.2. Fatores capazes de influenciar nas interações alelopáticas

Os trabalhos que tratam de alelopátia no fitoplâncton ainda são, em sua maioria, direcionados para verificar respostas alelopáticas consistentes, bem como o modo

de ação do aleloquímico. No entanto, já são encontrados estudos que descrevem diversas condições que podem modular a alelopatia. Legrand *et al.* (2003) afirmam que tanto a história dos organismos no ambiente, quanto o estado fisiológico das células em questão podem afetar a produção e ação do aleloquímico. Os autores também observam que, sendo a maior parte dos compostos alelopáticos desconhecida, a intensidade do efeito do material excretado complexo (exsudato total), sob diferentes condições de crescimento da cepa produtora ou receptora, costuma ser o indicador utilizado, e não o nível de produção de um aleloquímico específico.

Os fatores que influenciam interações alelopáticas podem ser de natureza abiótica ou biótica, como discutido a seguir.

1.3.2.1. Fatores abióticos

Os fatores abióticos são capazes de atuar estimulando/inibindo a produção do aleloquímico ou alterando a sensibilidade da célula alvo. Em geral espera-se um aumento da produção e do efeito alelopático em situações de estresse (Mulderij *et al.*, 2006; Leflaive & Ten-Hage, 2007).

Macronutrientes (Nitrogênio e Fósforo) e luminosidade são os fatores mais evidentes, dentre os que exercem pressão competitiva relacionada à evolução da alelopatia. Fistarol *et al.* (2005) relatam que o efeito alelopático do “filtrado celular” do dinoflagelado *Primnesium parvum* sobre a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* é intensificado quando esta é cultivada em meio com limitação de nitrogênio e fósforo. A própria produção do aleloquímico por *Primnesium parvum* também parece ser intensificada sob essas condições (Granéli & Johansson, 2003).

Quanto à influência da intensidade luminosa, van Rijssel *et al.* (2007) registraram um incremento do efeito hemolítico do exsudato de *Phaeocystis pouchetii* (Primnesiófita), quando cultivada sob menores intensidades luminosas. No entanto, como o “filtrado celular” foi produzido a partir de um mesocosmo e o teste hemolítico realizado em eritrócitos humanos, uma sólida discussão a respeito da produção de aleloquímicos pela espécie fica impossibilitada. Os mesmos autores afirmam que a temperatura foi outro fator que apresentou relação direta com o efeito encontrado. Também já foi encontrada relação positiva entre o pH do meio de cultivo e o efeito tóxico do exsudato da Haptófito *Chrysochromulina polylepsis* sobre a mobilidade de *Heterocapsa triquetra* (Dinoflagelado) (Schmidt & Hansen, 2001).

1.3.2.2. Fatores bióticos

Nem todas as espécies fitoplanctônicas devem ser produtoras de aleloquímicos, assim como nem toda espécie é afetada da mesma maneira por um potencial aleloquímico. Portanto, a espécie estudada é o primeiro fator biótico a ser considerado. Além disso, a atividade alelopática parece ser diferenciada entre diferentes linhagens da mesma espécie (Fistarol *et al.* 2004). Dentre as três cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* testadas por Figueredo *et al.* (2007), o “exsudato” de uma delas não apresentou efeito inibitório sobre a atividade fotossintética da clorófito *Coelastrum sphaericum*.

O estado fisiológico da célula produtora também parece influenciar a atividade alelopática de seu exsudato. “Filtrados celulares” retirados do dinoflagelado *Alexandrium minutum* em fase estacionária causaram maior inibição sobre o crescimento de *Chaetoceros gracile* (diatomácea) em comparação àqueles retirados de culturas em fase exponencial (Arzul *et al.* 1999). Resultados contrários foram

encontrados por Suikannen *et. al.* (2004), já que o “filtrado celular” da cianobactéria *Nodularia spumigena*, apresentou ação alelopática sobre a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* e a criptofíceia *Rhodomonas SP.* apenas se obtido durante a fase exponencial, e não se obtido a partir do período estacionário de crescimento.

Um importante fator a ser explorado é o estímulo da produção do aleloquímico pela presença da própria célula alvo. Talvez a maior dificuldade para seu estudo seja metodológica. Soares (2008) verificou a inibição do aparato fotossintético de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CyRF-1) pelo “filtrado celular” de sua cultura mista com uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (MiRF-1), o que não ocorreu quando o “filtrado celular” foi retirado de monoculturas de CyRF-1 e de MiRF-1. A autora sugere que a inibição observada tenha sido resultado de compostos produzidos sob estresse, causado pela competição entre as duas. No entanto, esse desenho experimental restringe a interpretação do resultado por dois motivos: primeiro não se pode concluir se o fator responsável pela maior inibição foi a limitação de recursos, causada pela competição indireta. Além disso, também não é possível diferenciar efeitos alelopáticos de um potencial efeito de “Quorum Sensing” imposto pelo material excretado pela própria cepa alvo. Para responder tal questão, um novo desenho experimental precisaria ser desenvolvido.

Apesar da grande importância, o reconhecimento dos fatores que regulam as interações alelopáticas não é suficiente para entender o papel dessas interações no ambiente. A identificação da(s) molécula(s) causadoras do efeito também é essencial para se atingir este objetivo. Os poucos trabalhos que identificaram aleloquímicos apontam para sua natureza química diversa. O isolamento e a descrição da estrutura molecular dos aleloquímicos ainda é pouco frequente, sendo

muitos desses compostos conhecidos apenas pelas suas características gerais, como peso molecular, espectro de atividade ou polaridade. Mesmo assim, atividades alelopáticas já foram associadas a ácidos graxos, alcalóides, peptídeos, aldeídos e poliéteres, o que sugere uma natureza química heterogênea (Legrand *et al.* 2003).

1.3.3. Cianotoxinas e alelopatia

Por não apresentarem função essencial ao metabolismo celular básico, os aleloquímicos são considerados metabólitos secundários. Isso, aliado a sua característica bioativa inibitória, torna lógica sua busca dentre as cianotoxinas e toxinas de microalgas em geral (Leflaive & Ten-Hage, 2007). No entanto, é bastante provável que nem todas as cianotoxinas tenham este potencial. Suikannen *et al.* (2006) não encontraram evidências de que Nodularina, uma cianotoxina pentapeptídica produzida por *Nodularia spumigena* e *Aphanizomenon flos aquae*, fosse o agente da inibição causada pelo material excretado de ambas sobre diversas espécies fitoplanctônicas do Mar Báltico.

Por outro lado, diversos trabalhos descrevem efeitos alelopáticos *in vitro*, com outras cianotoxinas. Anatoxina-a, um alcalóide neurotóxico produzido por *Anabaena flos-aquae*, não parece ser responsável pela imobilização de *Chlamydomonas reinhardtii* (clorofícea), observada quando as duas espécies se encontram no mesmo ambiente. No entanto, Microcistina-LR, produzida pela mesma espécie, parece ter sido a molécula responsável pelo efeito observado (Kearns & Hunter, 2000).

Talvez microcistinas sejam as cianotoxinas mais testadas como possíveis compostos alelopáticos (Leflaive & Ten-Hage, 2007), tendo sido encontradas

evidências positivas de seu acúmulo e inibição em macroalgas e plantas aquáticas (Pflugmacher, 2002; Duda & Tarczynska, 2002; Mitrovic *et al.*, 2004; Jang & Takamura., 2007). Dentre os efeitos estão a inibição do crescimento, o bloqueio da formação de raízes, a diminuição do número de frondes e o aumento das espécies reativas de oxigênio. Seus efeitos sobre o fitoplâncton também são diversos, incluindo mudanças morfológicas e fisiológicas (Hu *et al.* 2004; Sedmak & Elersek, 2005.).

Tais exemplos, em que um cianopeptídeo tóxico é capaz de induzir efeitos alelopáticos em espécies competidoras, torna promissora a busca de novas interações alelopáticas mediadas por esse grupo de moléculas.

1.4. CIANOPEPTÍDEOS NÃO TÓXICOS E ALELOPATIA

Segundo Welker e von Döhren (2006), já foram descritos mais de 600 oligopeptídeos produzidos por cianobactérias (Cianopeptídeos), sendo agrupados em 6 classes principais de acordo com os autores (aeruginosinas, microgininas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas, microcistinas, microviridinas e cicloamidas). Em 2006 foi finalizado um grande projeto de pesquisa financiado pela Comunidade Européia, PEPCY (Chorus, 2006), que teve como um dos objetivos avaliar a toxicidade desses compostos, além das já conhecidas microcistinas e nodularinas. O relatório final gerado pelo grupo afirma que nenhum dos cianopeptídeos “não microcistínicos” testados apresentou indícios de atividade mutagênica, necrótica/apoptótica ou citotóxica, sobre linhagens celulares distintas. Também foram encontrados resultados negativos em bioensaios “in vivo” com ratos (Chorus, 2006).

Por outro lado, diversos trabalhos já apresentaram bioatividade positiva desses compostos. A inibição de tripsina (Okino *et al.*, 1993), inibição de tirosinase (Ishitsuka *et al.* 1990) e inibição de carboxipeptidases (Itou *et al.*, 1999), são alguns exemplos.

A atividade biológica dos cianopeptídeos é de grande interesse farmacológico, no entanto pouco auxilia na interpretação de seu significado ecológico e fisiológico (Welker & von Dohren, 2006). Dada a grande variedade desses compostos é provável que exerçam diferentes funções, bem como apresentem significados ecofisiológicos variados. Ao observar que os peptídeos cíclicos Planktopeptina BL115, Abaenopeptina B e Anabaenopeptina F causam a lise celular por indução do ciclo lítico de fagos, Sedmak *et al.* (2008) assumem que estes cianopeptídeos possam participar do controle populacional de *Microcystis aeruginosa*, induzindo o colapso das florações. Nada impede que essas moléculas atuem em interações alelopáticas, já que são produzidas por diversas espécies de cianobactérias (Welker & von Dohren, 2006).

Em relação a uma possível participação de cianopeptídeos como aleloquímicos, Leão *et al.*(2010) apresentaram, de forma bastante consistente, evidências da ação sinérgica entre dois cianopeptídeos cíclicos, isolados e caracterizados estruturalmente, na inibição de *Chlorella vulgaris*. Apesar disso, o autor não observou efeitos tóxicos do composto em organismos superiores. Desse modo, a busca de aleloquímicos nesse grupo de moléculas pode gerar resultados bastante positivos.

1.5. ALELOPATIA ENTRE *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*: O CASO DO RESERVATÓRIO DO FUNIL

O Reservatório do Funil, localizado no município de Resende, Rio de Janeiro, sofre um intenso processo de eutrofização, ao longo das últimas duas décadas (Ferrão – Filho *et al.*, 2009). Com isso, é recorrente o estabelecimento de florações de cianobactérias no local, durante os períodos mais quentes e de maior aporte de nutrientes.

Soares *et al.* (2009), registrou uma biomassa total ao longo do ano representada em 97% por cianobactérias, sendo três espécies consideradas dominantes: *Anabaena circinalis*, *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii*. Além disso, foi observada a substituição entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*, sugerindo uma possível influência da produção de aleloquímicos no processo. Experimentos em “batch” demonstraram influência negativa na taxa de crescimento e no funcionamento do aparato fotossintético de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborski* isolada do reservatório, quando cultivada em meio enriquecido com o filtrado celular da cultura mista composta pelas duas espécies. Esses resultados incentivam a busca de novas abordagens experimentais que permitam aprofundar o tema, o que constitui o objetivo da presente dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Investigar uma possível interação alelopática entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* representadas por duas cepas isoladas do Reservatório do Funil, Resende, Rio de Janeiro (RJ).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do material excretado por uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CyRF-1) sobre o crescimento e outros indicadores do estado fisiológico de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (MiRF-1).

- Verificar o efeito do material excretado de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CyRF-1) sobre a produção de microcistinas e demais cianopeptídeos por uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (MiRF-1).

- Verificar o efeito do material excretado de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (MiRF-1) sobre o crescimento e alguns indicadores do estado fisiológico de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CyRF-1).

- Verificar se o material excretado de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CyRF-1) estimula a produção de aleloquímicos por *Microcystis aeruginosa* (MiRF-1).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS UTILIZADAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As cepas MiRF-1 (*Microcystis aeruginosa*) (Figura 1a) e CyRF-1 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) (Figura 1b) foram isoladas em 2006 no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O isolamento foi feito a partir de amostras coletadas do Reservatório do Funil

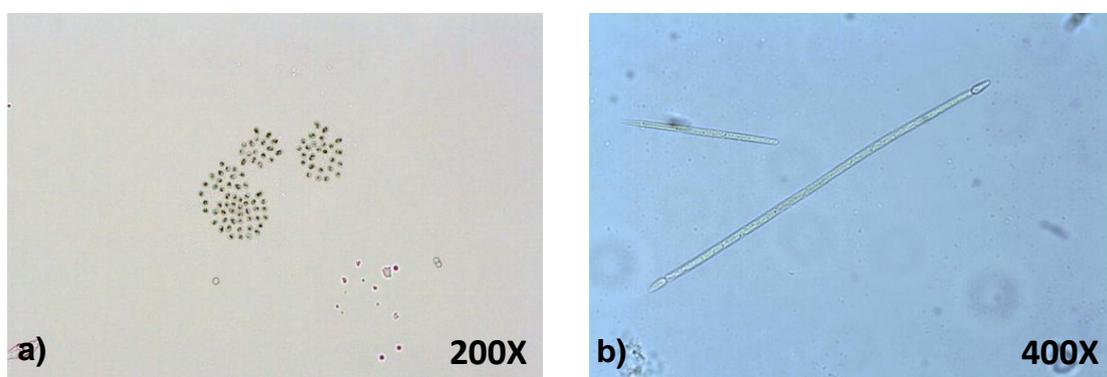


Figura 1. Micrografias de a) *Microcystis aeruginosa*, cepa MiRF-1 e b) *Cylindrospermopsis raciborskii*, cepa CyRF-1, utilizadas no trabalho

MiRF-1 se apresenta, em cultivos atuais, preferencialmente na forma de células livres, formando poucas colônias, com escassa mucilagem e células espaçadas. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Resolução sugerem a produção de pelo menos duas variáveis de microcistinas (dados não publicados). A confirmação por espectrometria de massas ainda não foi realizada.

CyRF-1 foi identificada como produtora de duas variantes de saxitoxinas. Essa cepa não produz cilindrospermopsina, o que foi confirmado por espectrometria de massas (dados não publicados).

Todos os cultivos foram realizados em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964). A luminosidade foi estabilizada em $40\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (fotoper\u00edodo 12:12), utilizando um sensor qu\u00e2ntico acoplado a um integrador radiom\u00e9trico (Li-Cor Inc.,

USA). A temperatura média de cultivo foi de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A aeração era verificada diariamente e ajustada de modo que não houvesse grande variação entre os tratamentos e entre as triplicatas.

3.2. PRODUÇÃO DE MEIO ASM-1 COM EXSUDATO PARA REALIZAÇÃO DE CULTIVOS CRUZADOS

Para produção do exsudato, a cepa produtora, MiRF-1 ou CyRF-1, foi cultivada até o final de sua fase exponencial (8 – 10 dias). Ao atingir densidades entre $1,0 \times 10^6$ cel/ml e $2,0 \times 10^6$ cel/ml, as culturas foram submetidas à filtração à vácuo, utilizando-se filtros de borossilicato e aparatos de filtração autoclavados. Em seguida, o meio livre de células de cianobactérias foi esterilizado em sistemas completos de filtração descartáveis e estéreis de poro igual a $0,22 \mu\text{m}$, da marca TPP.

O filtrado resultante era composto pelo restante de nutrientes do meio ASM-1, utilizados para o cultivo da cepa produtora e ainda não absorvidos, mais o material excretado pela cepa produtora (exsudato) durante seu cultivo e os potenciais produtos de degradação dessa matéria orgânica excretada por qualquer que seja o processo (ex: degradação bacteriana, fotodegradação).

Estes filtrados foram então adicionados em diferentes proporções ao meio ASM-1. Para que a concentração de nutrientes do novo meio ASM-1 não fosse diluída pela adição dos filtrados, ocasionando uma diferença entre os tratamentos e entre esses e o controle, foi realizada a seguinte correção. Para cada tratamento, estabeleceu-se um volume inicial V_i de água Milli-Q, de modo que a adição do volume do filtrado (V_f) sempre resultasse em um volume final igual ao do controle (V_c), sendo a quantidade de nutrientes, adicionada ao V_i , a mesma em todas as condições. Desse modo, a regra: " $V_i + V_f = V_c$ " e o fato de terem sido colocadas as

mesmas quantidades de nutrientes nos volumes iniciais, garantiram a mesma concentração de nutrientes inorgânicos em todas as condições e nos controles. O incremento nutricional ocasionado pelo restante do ASM-1 proveniente do cultivo da cepa produtora contido no filtrado celular foi ignorado, já que seu possível efeito sobre a promoção de crescimento, não atendia aos objetivos do presente trabalho.

A produção de meio ASM-1 com material excretado destinou-se a dois desenhos experimentais, baseados em cultivos cruzados, que consiste em cultivar uma espécie (cepa alvo) em meio enriquecido com o material excretado por outra espécie (cepa produtora), como descrito a seguir.

3.3.DESENHOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 **Experimento I: Efeitos de diferentes diluições do exsudato de CyRF-1 (cepa produtora) sobre MiRF-1 (cepa alvo).**

MiRF-1 (cepa alvo) foi cultivada em meio ASM-1 enriquecido com material excretado de CyRF-1, nas proporções de 10%, 20% e 50% em relação ao volume total de meio de cultivo. As condições de cultivo para todos os tratamentos, o controle e os inóculos estão indicados na figura 2, que ilustra o desenho experimental. O experimento foi realizado três vezes. Na primeira vez, realizou-se apenas o tratamento a 10%. O cultivo foi realizado durante 21 dias, tendo sido retiradas amostras apenas para avaliação do crescimento celular. Em seguida, diferentes concentrações do exsudato foram testadas, realizando-se o experimento com as concentrações 10%, 20% e 50% (Figura 2). Dessa vez, o cultivo foi realizado por 20 dias. Amostras foram retiradas para análise de crescimento celular e concentração de clorofila-a, a cada 2 dias. Além disso, o aspecto macroscópico do cultivo foi registrado através de fotografias. Por fim, o experimento foi repetido apenas para a condição de 50% de material excretado, por 20 dias. Amostras foram

retiradas para avaliação do crescimento celular (dias 0, 6, 12, 18, 20), carboidrato celular (dias 0, 6, 12, 17) clorofila-a e microcistina intra (Dias 0, 6, 20) e extracelular (0, 6, 12, 18 e 20 dias). Micrografias foram feitas após sedimentação das amostras em câmara de Uthermoll, com a finalidade de se registrar os aspectos microscópicos das colônias formadas.

As diferentes condições, em todos os experimentos, foram realizadas em triplicata e o controle consistiu em cultivos de MiRF-1 em meio ASM-1 sem adição de matéria orgânica excretada por CyRF-1.

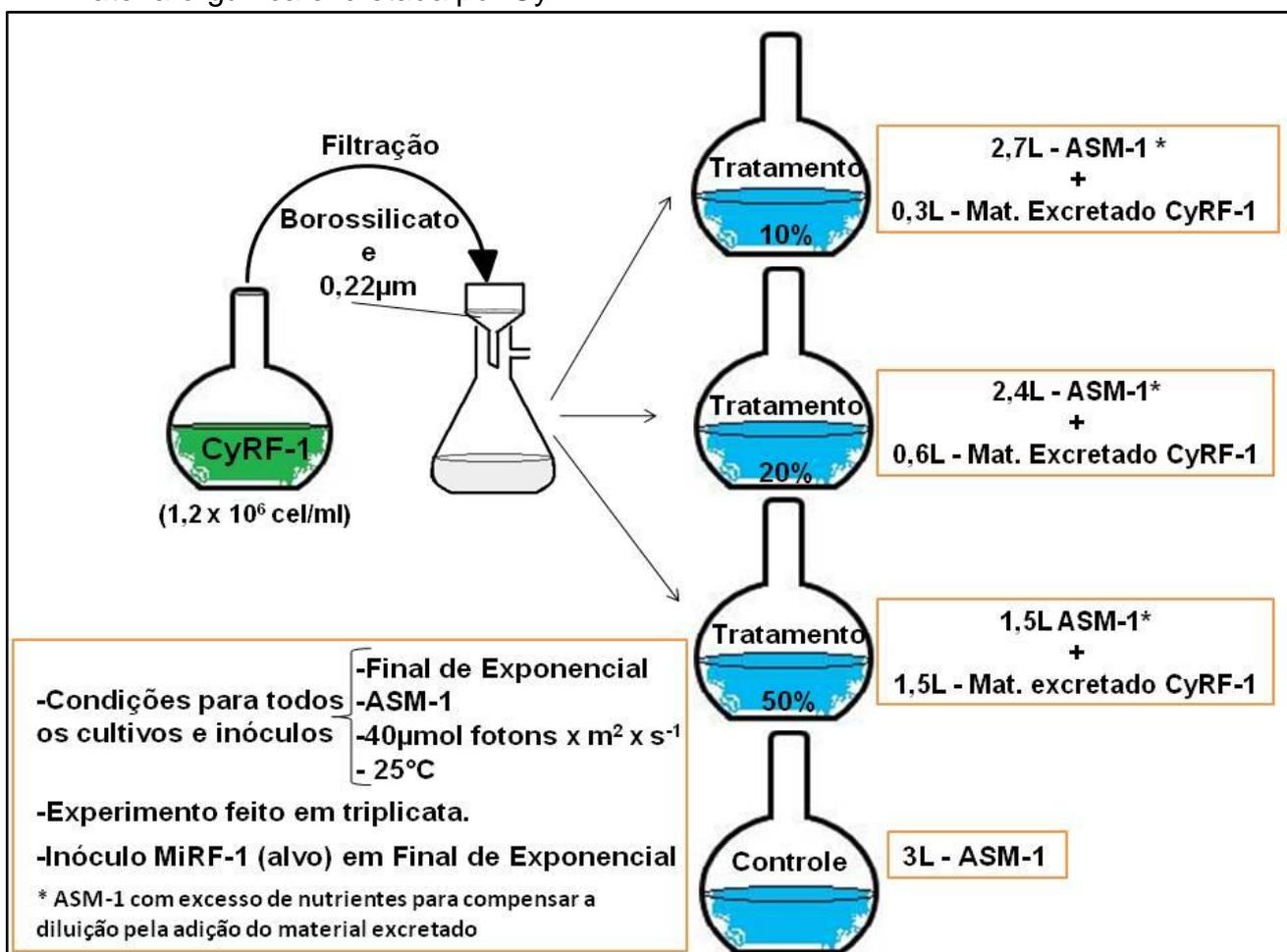


Figura 2. Experimento I - Cultivo de MiRF-1 em diferentes proporções de material excretado por CyRF-1. As densidades iniciais de MiRF-1 ao início do experimento foram próximas a 1 x 10⁵ cel/ ml e este durou 20 dias.

3.3.2 Experimento II: Efeitos alelopáticos do material excretado por MiRF-1 sobre CyRF-1

Esse experimento foi realizado com o intuito de verificar o efeito de possíveis aleloquímicos produzidos por MiRF-1 (cepa produtora), sobre a cepa de *C. raciborskii* CyRF-1 (cepa alvo). Além disso, foram realizados mais dois tratamentos como estímulos que poderiam potencializar a atividade alelopática de MiRF-1. Todas as condições de cultivo foram iguais às utilizadas para o Experimento I, sendo as culturas realizadas em triplicatas. O controle consistiu em cultivos de CyRF-1 em meio ASM-1 sem adição de matéria orgânica excretada por MiRF-1. O cultivo de CyRF-1 (alvo) em todas as condições durou 20 dias.

a) Teste alelopátia: CyRF-1 cultivada em material excretado por MiRF-1.

Este tratamento teve como finalidade testar o possível efeito alelopático do exsudato de MiRF-1 (cepa produtora) sobre CyRF-1 (cepa alvo). A cepa MiRF-1 foi cultivada em meio ASM-1 até atingir o final de sua fase exponencial (10º dia), quando as células foram retiradas e o filtrado esterilizado. O material excretado resultante foi, então, utilizado para compor o meio ASM-1 na proporção de 50% para o cultivo de CyRF-1 (cepa alvo). O cultivo se estendeu por 20 dias (Figura 3).

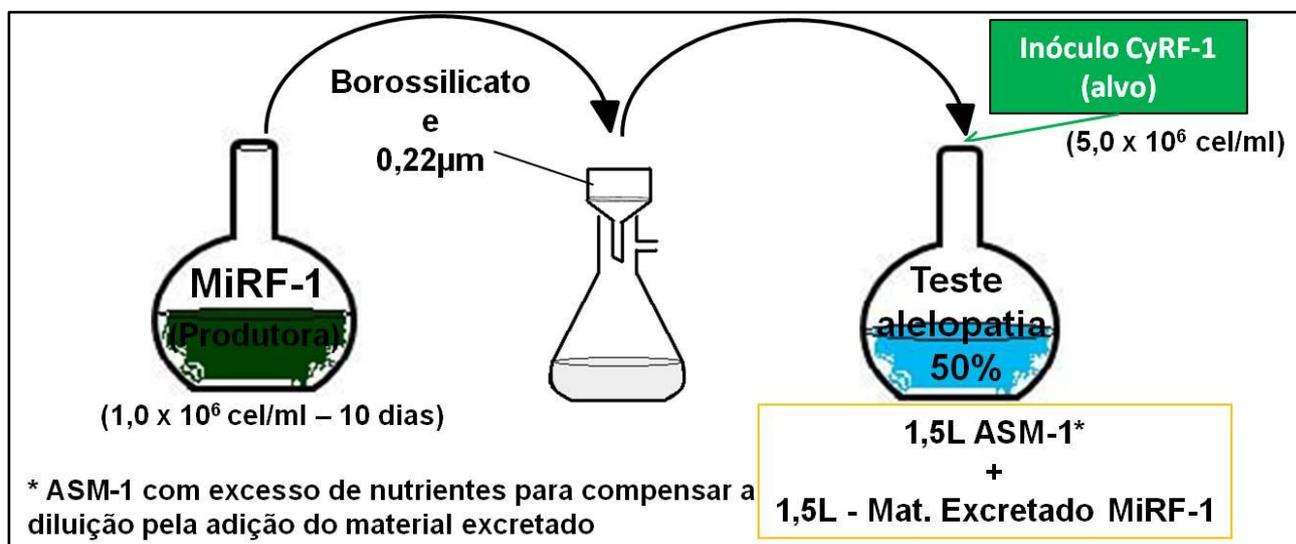


Figura 3. Experimento II – Teste alelopátia.. CyRF-1 crescendo por 20 dias em material excretado por MiRF-1 cultivada em ASM-1.

b) Tratamento estimulado: CyRF-1 cultivada em material excretado por MiRF-1 previamente estimulada pelo material excretado de CyRF-1

Para verificar um possível estímulo da produção de aleloquímicos por MiRF-1 mediado por material excretado de CyRF-1, a cepa de *C. raciborskii* foi cultivada em meio ASM-1 até a segunda metade de sua fase exponencial ($1,0 \times 10^6$ cel/ml – $2,0 \times 10^6$ cel/ml). As células foram retiradas por filtração em borossilicato e o material excretado esterilizado como descrito em 3.1.2. O conteúdo extracelular resultante foi utilizado na composição do meio ASM-1 para cultivo de MiRF-1 (cepa produtora), a uma proporção de 50%. Passados 10 dias, o material excretado desse cultivo foi utilizado para compor o meio de uma nova cultura de CyRF-1 (cepa alvo), novamente a uma concentração de 50% e o cultivo foi mantido por 20 dias. Esta condição foi chamada de *Tratamento Estimulado* (Figura 4).

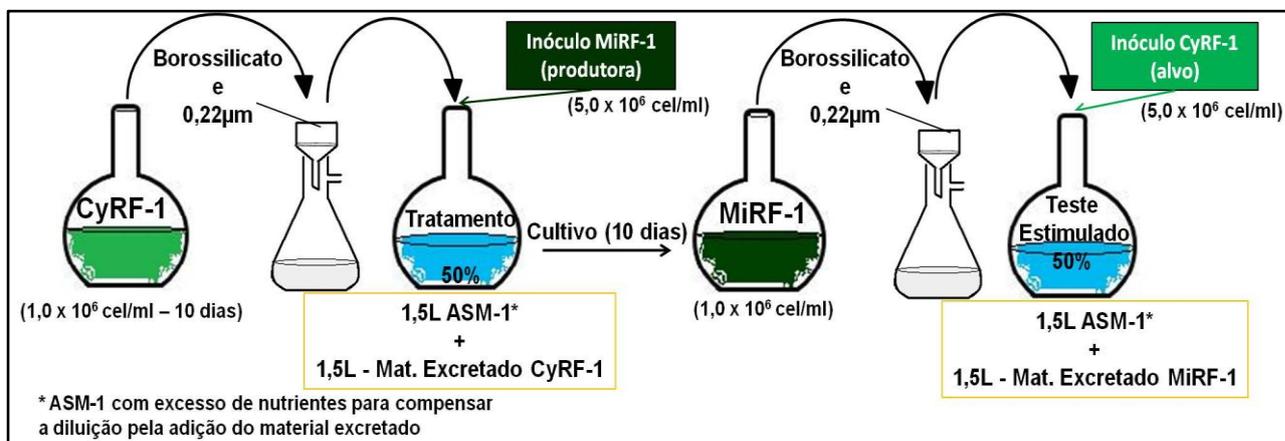


Figura 4. Experimento II - Tratamento estimulado. CyRF-1 crescendo em meio ASM-1 composto por material excretado de MiRF-1 previamente estimulada por material excretado de CyRF-1.

c) Teste sinergismo: CyRF-1 cultivada em material excretado por monocultura de MiRF-1 + material excretado por monocultura de CyRF-1.

O meio enriquecido utilizado para o cultivo da cepa alvo (CyRF-1) no *Tratamento estimulado* não devia conter apenas o exsudato de MiRF-1 supostamente estimulada, mas também moléculas excretadas originalmente pela própria CyRF-1.

Essa consideração é importante, já que não sabemos a taxa de degradação dessas moléculas. Portanto, esse tratamento teve a finalidade de testar o potencial sinergismo entre moléculas excretadas por MiRF-1 e CyRF-1 (Figura 5). Os resultados foram comparados com aqueles do *Tratamento estimulado*, para que estes pudessem ser interpretados com segurança como estímulo de MiRF-1 pelo exsudato de CyRF-1 e não apenas pelo fato de apresentar material excretado pelas duas cepas.

Para isso, CyRF-1 foi cultivada em cultivo monoespecífico até a segunda metade de sua fase exponencial ($1,0 \times 10^6$ cel/ml – $2,0 \times 10^6$ cel/ml), em meio ASM-1. As células foram retiradas com filtros de borossilicato, e o filtrado livre de células mantido durante 10 dias, sob as mesmas condições de todos os cultivos. Enquanto isso, MiRF-1 também foi mantida em cultivo monoespecífico durante os mesmos dez dias. O tempo de 10 dias está de acordo com o tempo de contato de MiRF-1 com o material excretado de CyRF-1 no *Tratamento estimulado* e foi escolhido devido a resultados encontrados no Experimento I.

Após os 10 dias, o material extracelular de MiRF-1 foi separado por filtração em borossilicato e esterilizado de maneira já descrita anteriormente. O material extracelular de CyRF-1, obtido anteriormente, também foi esterilizado dessa forma. O meio extracelular resultante de ambas as culturas foi utilizado para compor o meio ASM-1, no qual CyRF-1 (cepa alvo) foi cultivada. A proporção final para o meio extracelular de MiRF-1 foi de 50% em relação à original, a fim de simular as condições do *Tratamento estimulado*. Para o material excretado de CyRF-1, utilizamos uma concentração de 25% em relação à original, já que por diluição seriada essa foi a concentração teórica no *Tratamento estimulado*, desconsiderando os efeitos de degradação.

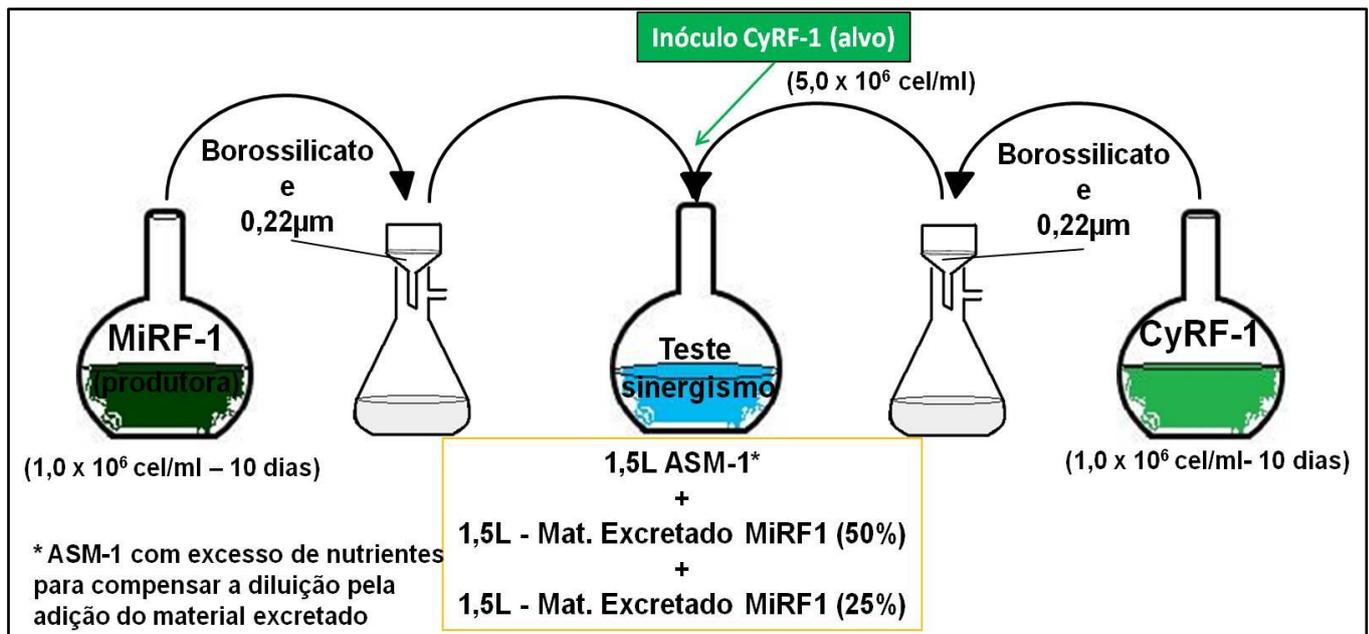


Figura 5. Experimento II – Teste sinergismo. CyRF-1 crescendo em material excretado por MiRF-1 (50%) em monocultura + Material excretado por CyRF-1 (25%) em monocultura

3.4. ANÁLISES

3.4.1. Determinação da densidade celular para obtenção das curvas de crescimento

A densidade de células em cada cultivo foi determinada através de contagens em microscópio ótico, utilizando hemocitômetro Fuchs-Rosenthal. Para a contagem de MiRF-1, fez-se necessária a digestão prévia da mucilagem da colônia, a fim de favorecer uma melhor distribuição das células entre as áreas de contagem. A digestão foi feita adicionando-se 0,3 ml de hipoclorito de sódio comercial em 1,7 ml de cultura. Tal concentração foi definida como a menor que propiciasse a total separação das colônias, sem que se observasse a ruptura de células. Após a adição do hipoclorito de sódio, a mistura era agitada em “vortex” (3000 RPM) por 40 segundos, aproximadamente.

Para a contagem de CyRF-1, os filamentos foram medidos e a soma de suas medidas divididas pelo tamanho médio celular. Este foi calculado a partir da medição de 30 células em uma determinada amostra.

O número de células de MiRF-1 contadas e de CyRF-1 estimadas foi multiplicado pelo fator de conversão da câmara, de acordo com a quantidade de áreas percorrida. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator de diluição realizado. A diluição do hipoclorito de sódio para MiRF-1 foi considerada.

Para comparação do crescimento celular entre as culturas foram utilizadas a taxa de crescimento e o rendimento.

A **taxa de crescimento** foi calculada de acordo com Fogg & Thake (1987), a partir da seguinte equação:

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

Onde:

μ = Taxa de crescimento

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

* N_1 e N_2 representam densidades celulares determinadas após no início e no final da fase exponencial de crescimento, respectivamente.

A velocidade máxima de crescimento foi calculada a partir da fase exponencial, que foi identificada por comparação par a par das velocidades de crescimento em cada intervalo temporal. O intervalo escolhido foi o maior faixa no qual o R^2 da curva se mantinha acima de 0,95.

O **Rendimento** foi calculado do seguinte modo:

$$R = R_1 / R_0$$

Onde:

R_1 = Número máximo de células / mL

R_0 = Número inicial de células / mL.

3.4.2. Determinação da concentração de clorofila-a

Um volume variável de cultura (10 ml – 2 ml) foi filtrado em borossilicato (13 mm.) e os filtros foram estocados em freezer -22°C ou -80°C (quando disponível), por no máximo uma semana, quando eram retirados para processamento das amostras. A extração foi realizada no escuro, adicionando-se 5 ml de metanol 100% aos filtros. Após 30 minutos as amostras foram centrifugadas por 10 min. a 1400g (Eppendorf- modelo 5403) e o sobrenadante utilizado para determinação da clorofila-a por espectrofotometria (Shimadzu - uv mini 1240). A leitura da absorbância da clorofila-a foi feita a 666nm e a correção da turbidez a 750nm. O coeficiente de extinção de Mackiney (1941) foi utilizado para realização do seguinte cálculo:

$$\text{Chla} = \text{c.v.coef}/V.1$$

Onde:

c= densidade óptica a 666nm – densidade óptica a 750nm

v = volume de metanol 100%, em ml

coef = 13,4

V = volume da amostra, em L

1cm = trajeto óptico

Para a determinação da concentração de clorofila-a/célula, este resultado foi dividido pela quantidade de células/ ml, encontrado a partir da contagem.

3.4.3. Determinação de pH

Os valores de pH do meio de cultivo foram determinados ao longo de todo o experimento, tanto no EXPERIMENTO I quanto no EXPERIMENTO II, com o auxílio de potenciômetro (Micronal B474), acoplado a um eletrodo Analyse calibrado com padrões de 4,0 e 7,0, à temperatura ambiente.

3.4.4. Extração e pré purificação de cianopeptídeos

Para análise de cianopeptídeo, incluindo as microcistinas, foi filtrado um determinado volume de cultura, que variou de acordo com sua densidade celular (300 ml – 50 ml). As amostras foram filtradas em borossilicato e este congelado até o momento da análise por cromatografia líquida de alta resolução.

Para cianopeptídeos em geral, o material foi extraído de acordo com Fastner *et al.* (1999). O filtro foi cortado em pequenos pedaços, coberto por Metanol 75% em um becker e, em seguida, submetido a ultrassom por 10 min a 25KHz (Modelo USC-1450, Unique). Logo após, foi colocado por 30 minutos em um agitador, e a seguir o material foi centrifugado por 10 minutos a 12900g. O sobrenadante foi então recolhido. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e os sobrenadantes agrupados para a pré purificação.

A pré purificação foi feita de acordo com Ferreira (2006). Inicialmente a composição dos sobrenadantes foi diluída até atingir concentração de Metanol igual a 10%, para que o solvente não competisse com a matriz pelos analitos e estes não fossem perdidos. O cartucho de ODS (Agilent C-18, 500mg, 6 ml) foi previamente ativado com 20 ml de Metanol 100% e depois com 20 ml de H₂O Milli-Q. Em seguida, a amostra diluída foi passada no cartucho e este foi lavado com 20 ml de H₂O Milli-Q. Por último a amostra foi eluída com 20 ml de Metanol 90%. Após a eluição cada amostra foi evaporada em ar comprimido e ressuspensa em Metanol 50% para análise por Cromatografia Líquida de Alta Resolução.

3.4.5. Análise de cianopeptídeos por Cromatografia Líquida em Alta Resolução (HPLC)

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento modular de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) da Shimadzu. Foram utilizadas

bombas LC 10AT para estabelecimento do fluxo e do gradiente e um fotodetector de diodo (SPD-M10A). As condições cromatográficas foram estabelecidas baseadas em Lawton *et al.* (1994), que se utiliza de gradiente de acetonitrila aquosa (0,05% TFA) a um fluxo de 1 ml/min , em uma coluna Lichrospher 100, ODS, 5 µm, LichroCART 250-4. O gradiente é apresentado na TABELA I.

Tabela I – Gradiente Linear para eluição de cianopeptídeos (HPLC)
(Lawton *et al.*, 1994)

	Tempo (min.)						
	0	10	40	42	44	46	50
Solvente A (H ₂ O - 0,05% TFA)	70	65	30	0	0	70	70
Solvente B (Acetonitrila – 0,05%TFA)	30	35	70	100	100	30	30

3.4.6. Quantificação de microcistinas extracelulares

Para a determinação das concentrações de microcistinas dissolvidas (Experimento I), volumes determinados de cultura foram filtrados em borossilicato e o volume filtrado foi conservado a -20°C até o momento da análise, quando então foram filtrados novamente em filtros de celulose regenerada (0, 45µm). O método de imunoenensaio enzimático (ELISA) foi utilizado para análise, através de kits comerciais da Beacon Analytical Systems (Portland, EUA), de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante.

3.4.7. Extração e determinação das concentrações de carboidratos

A determinação da concentração de carboidratos celulares (intracelular e mucilagem) foi realizada pelo método fenol/ácido sulfúrico descrito por Dubois *et*

al.(1956) e adaptado para organismos fitoplanctônicos por Myklestad e Haug (1972).

As culturas foram filtradas em filtros de borossilicato com diâmetro de 13 mm. Como a extração e a análise não foram realizadas imediatamente após a amostragem, foram realizados procedimentos para conservação e preservação das amostras. Desta forma, após filtrar cada amostra, os filtros contendo as células foram mantidos a uma temperatura de -20°C

Para a extração dos carboidratos celulares, aos filtros foi adicionado 1,0 ml de ácido sulfúrico 80% com um período de incubação de 20 horas em temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida com adição de 6,0 ml de água Milli-Q em banho de gelo. Foram retiradas alíquotas de 1,0 ml desse extrato e acrescentados 1,0 ml de fenol 5% e 2,5ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos para reação e resfriamento da solução, a leitura da densidade óptica foi feita por espectrofotometria (Shimadzu –uv mini 1240) em 485 nm.

Os resultados foram expressos em absorbância/ 10^5 células para comparação entre as respostas nas condições Controle e Tratamentos.

3.4.8 .Análise estatística

As análises utilizadas consistiram em Teste-t e ANOVA, a depender do número de tratamentos existentes no experimento. Sendo assim, as análises estatísticas se deram da seguinte maneira para cada variável e experimento:

-EXPERIMENTO I – ANOVA (Crescimento celular; Clorofila-a total e intracelular)

-Repetição do EXPERIMENTO I (apenas condição 50%) – Teste-t (Crescimento celular, concentração de microcistina intracelular, concentração de microcistina extracelular, carboidrato intracelular .)

-EXPERIMENTO II – ANOVA (Crescimento celular, Clorofila-a total e intracelular.)

;Para a verificação de diferenças estatisticamente significativas do crescimento

celular foram comparadas a velocidade máxima de crescimento e o Rendimento, entre os tratamentos.

Experimento I

Tratamentos 10%, 20% e 50%: **Exsudato CYRF-1 → MIRF-1**
(10%, 20%, 50%)

Experimento II

1) Tratamento alelopátia: **Exsudato de MIRF-1 → CYRF-1**
(50%)

2) Tratamento Estimulado: **Exsudato de MIRF-1**
estimulada por exsudato de CYRF-1 → CYRF-1

3) Tratamento sinergismo: **Exsudato de MIRF-1 + Exsudato de CYRF-1 → CYRF-1**

3.5. RESUMO DOS EXPERIMENTOS

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados permitem abordagens não usuais para se discutir possíveis interações alelopáticas entre *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Essas espécies foram representadas, neste estudo, pelas cepas MiRF-1 e CyRF-1, respectivamente.

4.1 EXPERIMENTO I: EFEITOS ALELOPÁTICOS DE DIFERENTES DILUIÇÕES DO MATERIAL EXCRETADO POR CyRF-1 SOBRE MiRF-1 (ALVO)

Inicialmente cultivou-se MiRF-1 em uma concentração de exsudato de CyRF-1, diluído a 10% da original em meio ASM-1 e comparou-se com a condição controle (ASM-1). A Figura 6 apresenta o resultado desse primeiro experimento. Apesar dos cultivos terem se iniciado com aproximadamente metade da densidade pretendida, o que disponibilizaria mais moléculas de um possível aleloquímico por célula, estes não demonstraram indícios de interações alelopáticas, sob esta diluição do exsudato, nessas condições de cultivo.

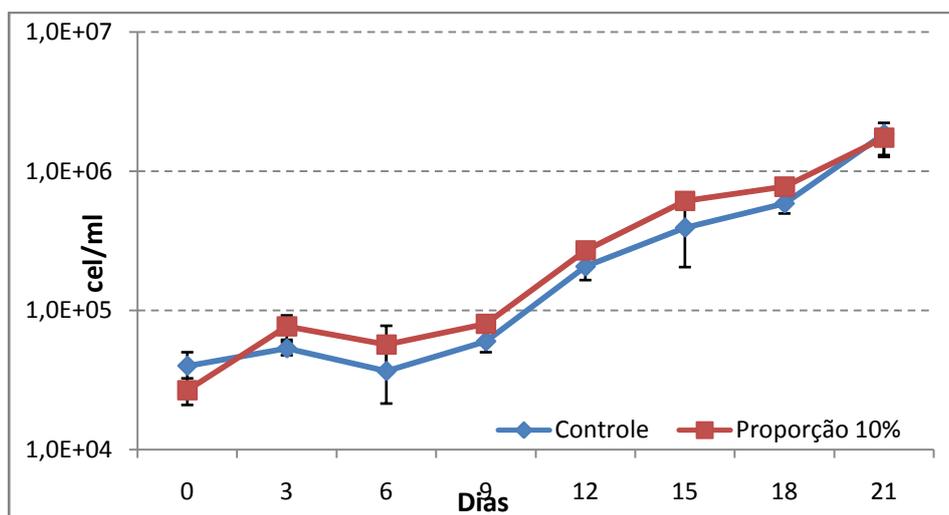


Figura 6. Curvas de crescimento de MiRF-1 cultivada em material excretado de de CyRF-1 diluído a 10% em ASM-1. Controle constituído por MiRF-1 cultivada em meio

Curvas de crescimento de MiRF-1 em meio constituído por diferentes

diluições do material excretado por CyRF-1 foram realizadas e são apresentadas na Figura 7.

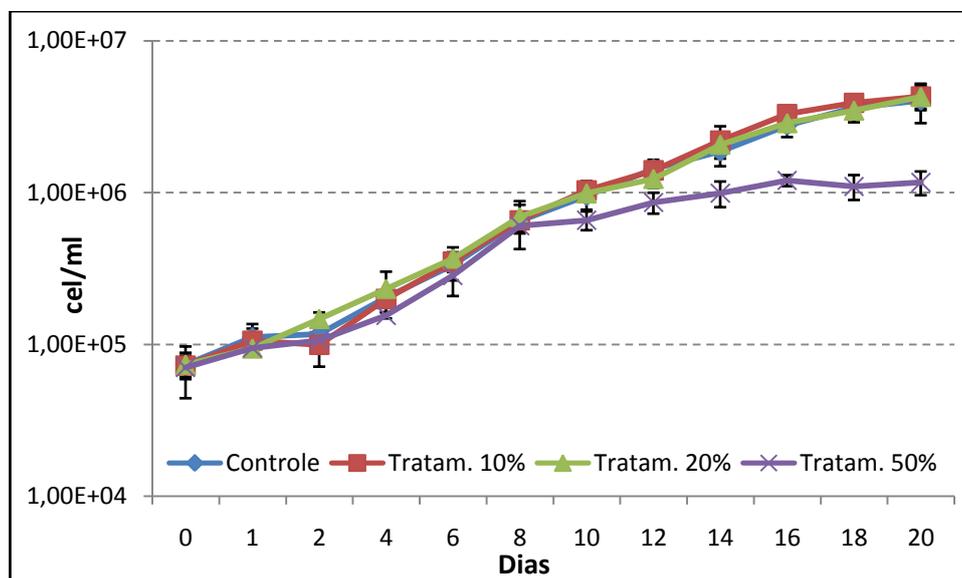


Figura 7. Curvas de crescimento de MiRF-1 em diferentes concentrações do material excretado de CyRF-1. O material excretado foi diluído para concentrações de 10%, 20% e 50% em relação ao original, em meio ASM-1. Controle constituído por meio ASM-1 convencional.

A curva de crescimento que representa o cultivo em exsudato diluído a 50% apresenta evidente inflexão a partir do oitavo dia de cultivo, o que sugere a entrada antecipada da cultura em fase estacionária.

A Tabela II apresenta a taxa de crescimento e rendimento máximo da cultura em cada tratamento, confirmando quantitativamente as observações apresentadas anteriormente. Apesar do menor rendimento máximo no tratamento “Concentração 50%”, não houve diferença significativa na taxa de crescimento entre as condições testadas.

O rendimento máximo da “Concentração 50%” foi aproximadamente três vezes mais baixo, em comparação aos outros tratamentos e ao controle, demonstrando a importância da concentração de exsudato no possível efeito alelopático, que se refletiu na redução da biomassa produzida. Faz-se necessário,

entretanto, verificar se a concentração no tratamento com material excretado diluído a 50% é coerente com aquelas possivelmente encontradas no ambiente.

TABELA II - Indicadores do crescimento de MiRF-1 durante o Experimento I

(* indica diferença significativa segundo o teste ANOVA – Significância < 0,05)

	Taxa de crescimento (μ)	Rendimento máximo (R)
Controle	0,29	55
Tratamento 10%	0,32	59
Tratamento 20%	0,32	58
Tratamento 50%	0,29	17*

Suikannen *et al.* (2004) destaca em seu trabalho a necessidade de se considerar a diluição dos aleloquímicos na massa d'água, ao se realizar experimentos “*in vitro*”. Esse seria um dos maiores impedimentos ao estabelecimento desse tipo de interação em ambientes aquáticos, já que o efeito alelopático deve estar diretamente relacionado à concentração desses compostos hidrossolúveis (Legrand *et al.* 2003). Portanto, faz-se sempre importante a busca pela maior diluição do exsudato capaz de induzir efeitos alelopáticos na cepa alvo.

A densidade de células produtoras (CyRF-1) utilizada no experimento pode servir como base para se comparar a quantidade de exsudato presente no tratamento “Concentração 50%” com as possíveis concentrações ocorrentes no campo. Em nossos experimentos, optamos por obter o material excretado a partir de cultivos com densidade da cepa produtora próxima a $1,2 \times 10^6$ cel/ml⁻¹, a qual é atingida quando as células se encontram no final da fase exponencial, para as condições de cultivo utilizadas. Portanto, considerando a diluição no tratamento “Concentração 50%”, podemos dizer que a concentração de exsudato utilizada se

equipara àquelas produzidas por populações de densidade próxima a $6,0 \times 10^5$ cel/ml e que já atingiram o final da fase exponencial. Essa densidade está de acordo com populações de *Cylindrospermopsis raciborskii* encontradas no ambiente, se considerarmos locais em que a espécie domina, formando florações (Hoehnea, 2008; Vidal e Kruk, 2008). Além disso, deve-se considerar que diferentes condições de cultivo podem estimular ou inibir a produção de aleloquímicos.

Muitos autores defendem a idéia de que, em geral, fatores estressantes para a célula atuam intensificando-a (von Elert & Jüttner 1997; Rengefors & Legrand 2001; Granéli & Johansson 2003). Granéli & Johansson (2003) observaram que apenas os filtrados celulares de *Prymnesium parvum* cultivada em meio deficiente de nitrogênio inorgânico e em meio deficiente de fósforo inorgânico, foram capazes de inibir o crescimento de três espécies fitoplanctônicas: *Thalassiosira weissflogii* (diatomácea), *Prorocentrum minimum* (dinoflagelado) and *Rhodomonas cf. báltica* (criptofíceas). O mesmo não ocorreu em condição de suficiência para ambos os nutrientes. Dessa maneira, o mecanismo de regulação da produção de aleloquímicos parece estar diretamente ligado à oferta de nutrientes, o que estabelece uma forte relação entre essa interação e a competição por nutrientes. Considerando que em nosso trabalho a célula produtora foi cultivada sob condições luxuriantes de nutrientes, é provável que os efeitos observados estejam subestimados em relação ao que se espera encontrar em campo.

Em relação à baixa luminosidade utilizada para cultivo da cepa produtora nos experimentos ($40 \mu\text{mol f\u00f3tons} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$), quando comparada a aquelas encontradas no reservatório, podemos verificar que estudos com outras cepas de *C. raciborskii* indicam que esta intensidade não parece representar estresse para a espécie, que é considerada adaptada à condição de sombreamento (Wu & Li, 2009).

Além disso, como parte do presente trabalho, resultados preliminares de cultivo de CyRF-1 em $40 \mu\text{mol f\u00f3tons} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol f\u00f3tons} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Figura 8) demonstraram n\u00e3o haver aparentemente diferen\u00e7a nas taxas de crescimento e rendimento m\u00e1ximo dessa cepa sob essas disponibilidades de energia luminosa. O menor crescimento observado a partir do sexto dia de cultivo poderia estar relacionado com o menor oferta de energia luminosa, mas a curva obtida classicamente n\u00e3o indica ter havido uma redu\u00e7\u00e3o no crescimento por estresse.

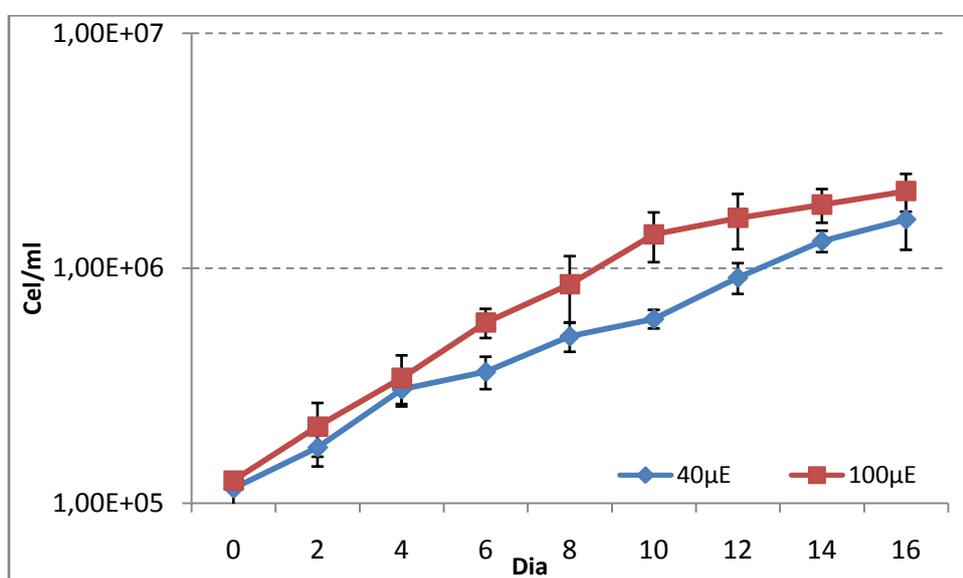


Figura 8. Curvas de crescimento de CyRF-1 em luminosidades de 40uE e 100uE

Jonsson *et al.* (2009) reuniram dados demonstrando que 98% das pesquisas em alelopatia capazes de detectar efeitos significativos *in vitro*, utilizaram concentra\u00e7\u00f5es de c\u00e9lulas produtoras j\u00e1 t\u00edpicas de flora\u00e7\u00f5es ($\text{chl-a} > 5 \mu\text{g/L}$). Com isso, os autores concluem que n\u00e3o h\u00e1 evid\u00eancias de que esse tipo de intera\u00e7\u00e3o promova flora\u00e7\u00f5es em condi\u00e7\u00f5es de alta dispers\u00e3o do material excretado ou sob baixa densidade celular. No entanto, \u00e9 poss\u00edvel que a libera\u00e7\u00e3o de aleloqu\u00edmicos seja capaz de prolongar a perman\u00eancia de flora\u00e7\u00f5es j\u00e1 estabelecidas, principalmente ao ocasionar lise de c\u00e9lulas alvo com conseq\u00fcente libera\u00e7\u00e3o de nutrientes na \u00e1gua. Nosso experimento est\u00e1 de acordo e parece simular situa\u00e7\u00f5es

em que a espécie produtora já se encontra em altas densidades, atingindo a ordem de 10^5 células/ml. Desse modo, de acordo com os resultados, a ação alelopática de *C. raciborskii* poderia ser capaz de suprimir sua substituição por boas competidoras, como *M.aeruginosa*, mas não de facilitar o desenvolvimento de altas densidades da espécie produtora.

Também foi observada a formação de maiores agregados macroscópicos de MiRF-1 quando cultivada em 50% de material excretado de CyRF-1, com sedimentação intensificada, em relação ao controle (Figura 9). De acordo com estudos realizados em nosso laboratório, maiores agregados e sedimentação são características típicas de uma cultura de *M. aeruginosa* em fase estacionária. Esse estado fisiológico pode ser induzido por comunicação química intra-específica (Santos, 2009). Como esse comportamento não se fez presente na condição controle, é possível interpretá-lo como consequência do efeito do material excretado por CyRF-1.

Não houve aparente diferença no grau de contaminação por bactéria heterotrófica entre os tratamentos, conforme avaliação em microscópio ótico. Em reforço a isso, frascos com volumes do material excretado foram mantidos abertos, durante a montagem do experimento e em alguns momentos de amostragem, no mesmo fluxo laminar utilizado em todas as etapas do experimento. Fora do fluxo, os frascos foram fechados e incubados sob condições de luz e temperatura semelhantes à condição de cultivo. Após 30 dias, esse material foi observado ao microscópio ótico, não tendo sido identificada a presença de bactérias heterotróficas (aumento 1000x), o que sugere um baixo potencial de contaminação, quando manipulado sob condições estéreis.

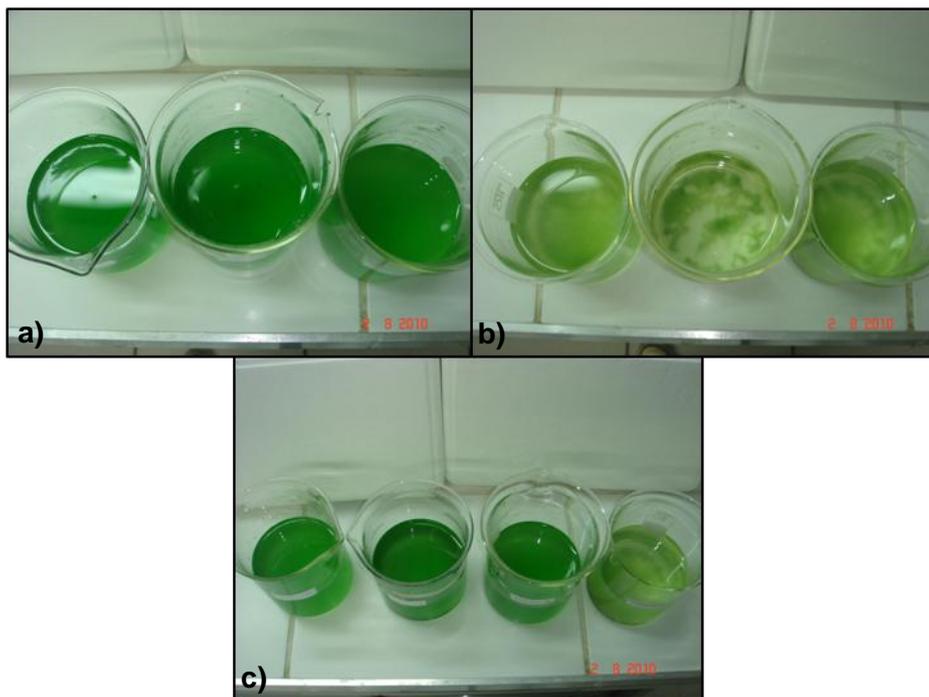


Figura 9 - Aspectos macroscópicos das culturas de MiRF-1 sob diferentes diluições do material excretado por CyRF-1, ao final do experimento I (20 dias). a) Controle b) Concentração 50% c) Comparação do aspecto de cada condição: Controle, Concentração 10%, Concentração 20% e Concentração 50%, da esquerda para a direita. Os frascos foram homogeneizados e mantidos em repouso por 10 minutos.

O pH do meio de cultivo foi verificado em todos os tratamentos ao longo do experimento para se ter certeza de que esse não foi diretamente afetado pela adição do material excretado por CyRF-1 (Figura 10). Qualquer modificação desse pH poderia afetar sensivelmente a disponibilidade de carbono dissolvido, ao modificar o equilíbrio entre as diferentes espécies de carbono (Ogawa & Kaplan, 2003.). De acordo com o gráfico da Figura 10, não houve aparente diferença entre os tratamentos ao longo do experimento até o oitavo dia, a partir de quando esta variável passou a apresentar menores valores para o tratamento 50% em relação aos outros tratamentos. Esse perfil acompanhou o do crescimento celular e sugere que o menor aumento de pH nesse tratamento corresponde às menores taxas de metabolismo autotrófico, consequência das menores densidades celulares. (Schneider & Campion- Alsumard, 1999).

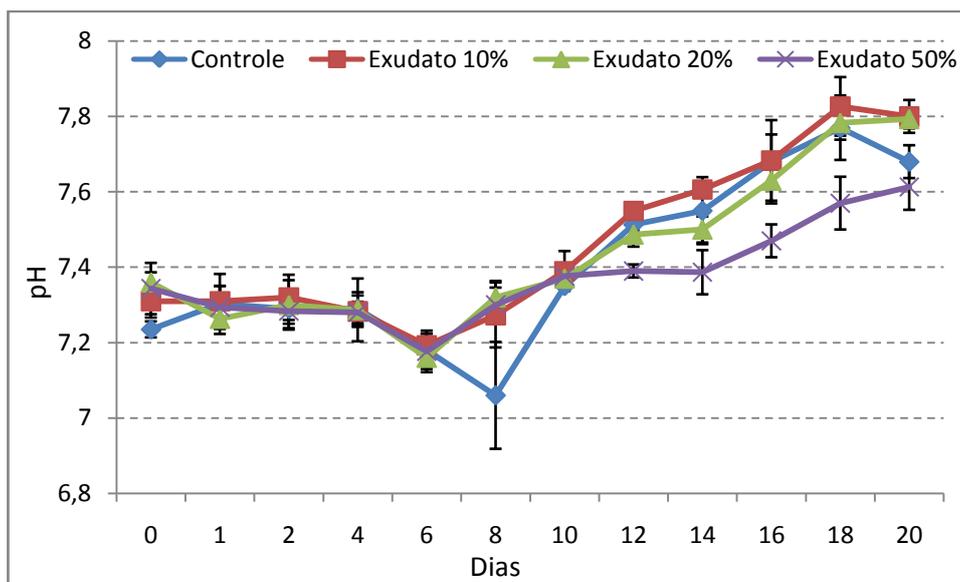


Figura. 10. Variação do pH no meio de cultivo dos diferentes tratamentos ao longo do EXPERIMENTO I

A grande maioria dos trabalhos que identificaram efeitos alelopáticos registrou efeitos negativos sobre a capacidade de divisão celular; uma consequência de prejuízos fisiológicos em geral ou de lesões na membrana celular (Rijssar *et al.*, 2007). No entanto, no presente experimento, a cepa MiRF-1 apresentou menor crescimento apenas a partir do oitavo dia de cultivo em presença do material excretado por CyRF-1. O fato de não terem sido observadas menores velocidades máximas de crescimento em nenhum tratamento em relação ao controle, sugere que tais danos não ocorreram em MiRF-1 quando cultivada em material excretado por CyRF-1 até a diluição a 50%.

Efeitos alelopáticos muitas vezes são consequências de danos no aparato fotossintético, afetando a assimilação de carbono e impedindo o crescimento da população. Muitos desses danos ocorrem por modificações no conteúdo de clorofila ou pelo efeito direto sobre o funcionamento do aparato fotossintético (Zhou & You 2003). A Figura 11 demonstra que no atual experimento não houve efeito sobre a produção de clorofila-a por MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1,

além de confirmarem os resultados encontrados a partir da contagem de células, já que a clorofila total acompanha a curva de crescimento (Figura 11a).

No presente experimento não analisamos o funcionamento do aparato fotossintético de MiRF-1. No entanto, testes fluorimétricos desta cepa já foram realizados por Soares (2008), que a cultivou em exsudato de CyRF-1 e o resultado não indicou efeitos sobre sua taxa de transporte de elétrons. Apesar de a autora ter se utilizado de condições nutricionais (meio de cultivo WC) e de luminosidade ($140 \mu\text{mol fotos} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) distintas, o resultado já é um indicativo da ausência desses efeitos.

O cultivo de MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1 na “Concentração 50%” foi repetido para que pudéssemos confirmar os resultados de inibição de crescimento de MiRF-1 em termos de rendimento máximo (Figura 12). Amostras para contagem de células foram retiradas a cada seis dias. O rendimento máximo do controle e tratamento foram, respectivamente, 51,2 (D.P. $\pm 15,9$) e 22,8 (D.P. $\pm 6,2$), apresentando diferença estatística (teste-t), a um intervalo de confiança de 95%. Além disso, não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento testadas (teste-t, 95%), cuja média foi igual a 0,2091 ($\pm 0,0279$) para o controle e 0,1799 ($\pm 0,0469$) para o tratamento. Portanto, os resultados reproduziram o observado no primeiro experimento. Além da contagem das células, outros parâmetros foram avaliados neste experimento: morfologia das células, dosagem de carboidratos, dosagem de toxinas e perfil de cianopeptídeos.

Quanto ao aspecto microscópico das células de MiRF-1, este foi avaliado após 20 dias de cultivo e as micrografias são apresentadas na Figura 12. É interessante notar que a maior agregação observada anteriormente (Figura 9), corresponde à formação de um maior número de grandes colônias. Além disso, no

tratamento com material excretado de CyRF-1 na concentração 50%, as colônias apresentam uma bainha de mucilagem bastante ampla, se comparada ao controle, com intensa formação de micro colônias.

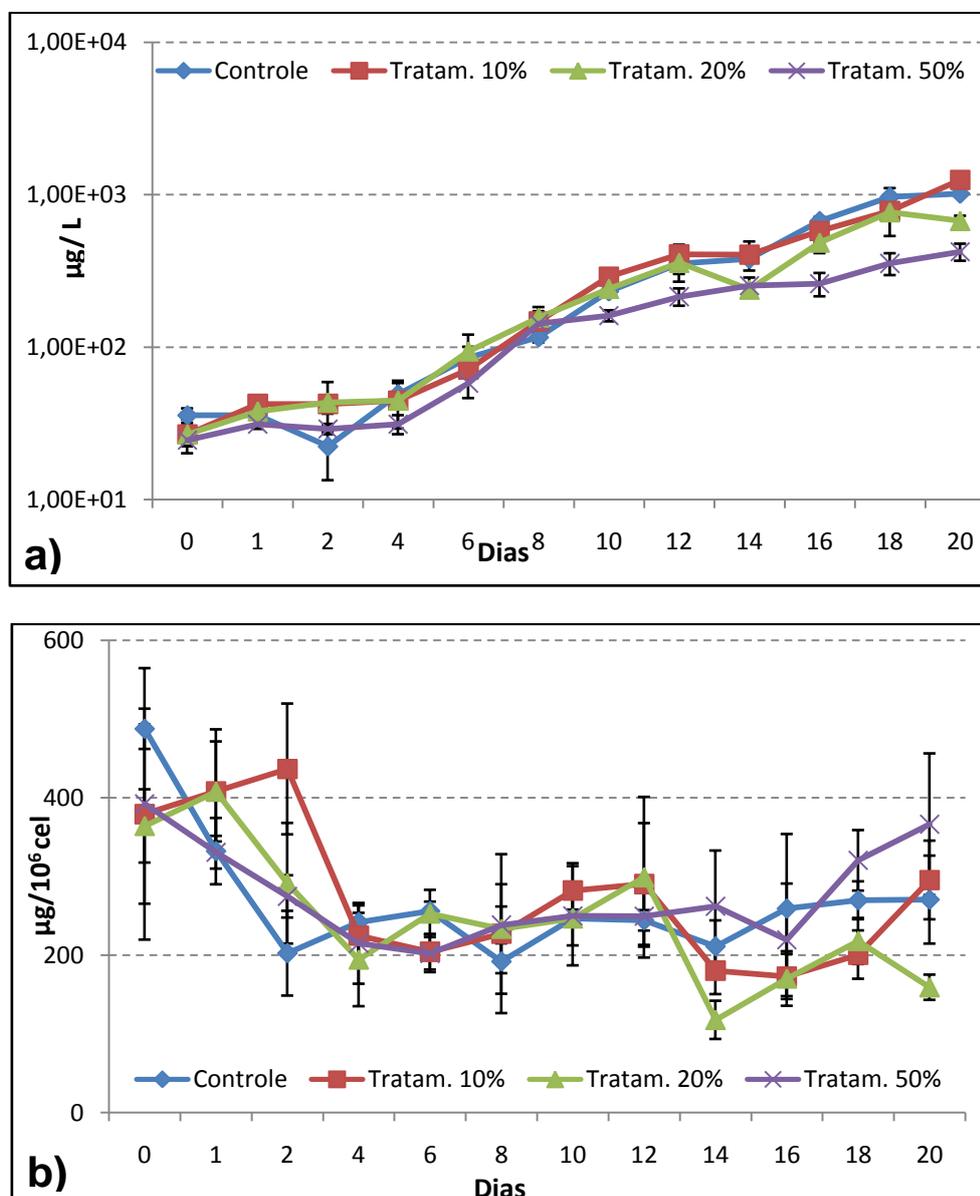


Figura 11. a) Clorofila-a total no cultivo e b) Concentração de Clorofila-a por 10⁶ células de MiRF-1 cultivada em diferentes concentrações do material excretado por Cyrf-1.

Muitos dos mecanismos fisiológicos e significados ecológicos relacionados à formação de colônia e produção de mucilagem por *Microcystis aeruginosa* podem ser discutidos sob o contexto das interações mediadas por compostos químicos. Já existem indícios de que filtrados de zooplâncton sejam capazes de induzir a

formação de colônia pela espécie, reduzindo seu risco de predação (Burkert *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009). A vantagem desse tipo de interação não pode ser atribuída à alelopatia, já que esta ocorre entre duas espécies competidoras e não entre predador/presa. Portanto, devem ser encontradas novas interpretações para o fenômeno observado neste trabalho.

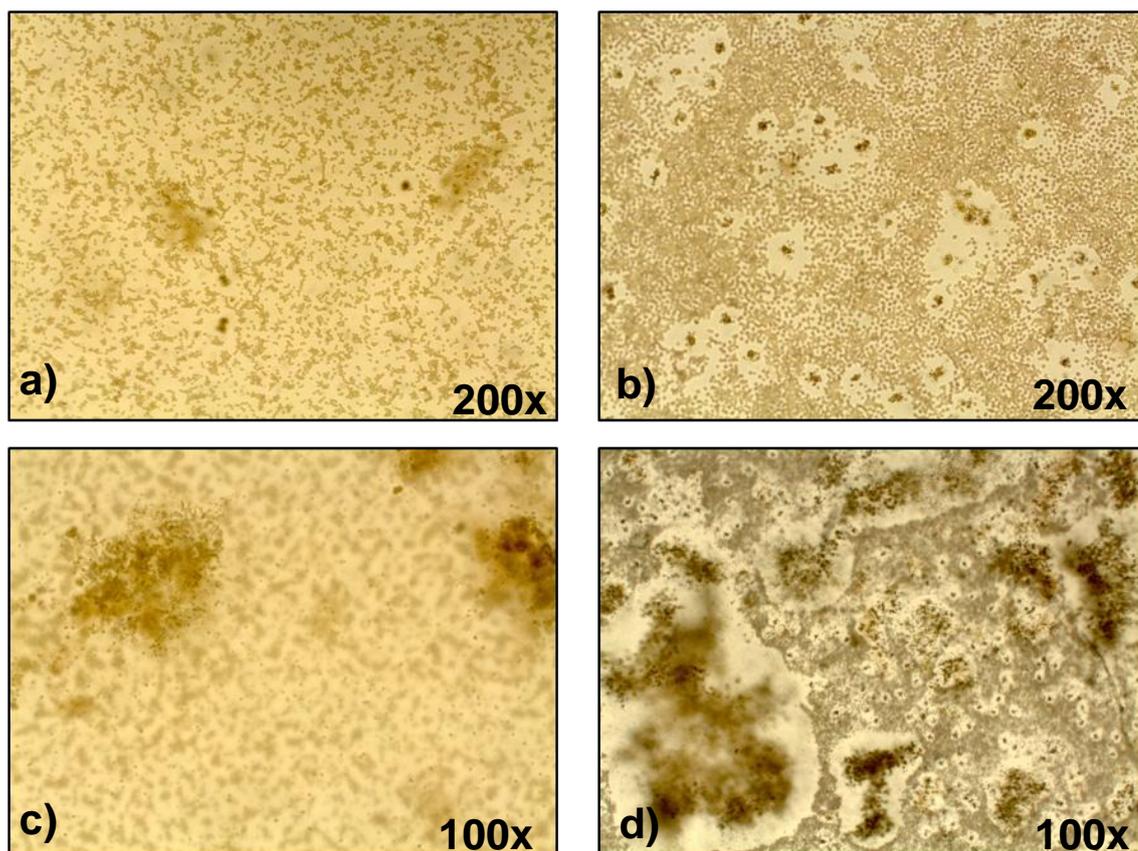


Figura 12. Aspecto microscópico de MiRF-1. a) Células isoladas controle b) células isoladas e micro colônias do cultivo em material excretado de CyRF-1 na concentração 50% c) Células isoladas e colônias, controle d) Células isoladas, micro colônias e grandes colônias do cultivo em material excretado de CyRF-1 na concentração 50%.

A agregação celular associada a menores taxas de crescimento e maiores taxas de sedimentação já foi observada na espécie de clorófitica *Scenedesmus obliquus*, quando exposta ao material excretado pela macroalga *Stratioides aloides* (Mulderij *et al.*, 2006). A liberação de aleloquímicos promotores do clareamento da água e da supressão de competidores foi considerada uma estratégia adaptativa

capaz de aumentar a disponibilidade de nutrientes para a macroalga produtora. Os autores destacam a importância da ocorrência desse efeito em períodos iniciais do crescimento da população, para que a sua supressão seja mais vantajosa.

Tal interpretação, clareamento da água, mediada por indução de agregação celular; e supressão de competidores, é coerente com nossos resultados. No entanto os aleloquímicos de CyRF-1 não produzem efeitos diretos sobre a taxa de duplicação e apenas reduzem o crescimento de MiRF-1, quando em concentrações já típicas de floração. Portanto, para esta cepa produtora, a estratégia dificilmente seria eficaz contra espécies com taxas de crescimento maiores do que a sua própria, e esta seria possivelmente excluída antes de atingir as concentrações mínimas para que o efeito alelopático fosse estabelecido.

A rápida e intensa sedimentação, já a partir do terceiro dia de exposição ao material excretado das células de MiRF-1 crescendo em exsudato de CyRF-1 diluído a 50% (Figura 9), deve estar diretamente relacionada à formação de colônias maiores observadas ao microscópio neste experimento (Figura 12). Kehr (2009) afirma que o tamanho da colônia é capaz de aumentar a velocidade de migração das células. O acúmulo de carboidrato intracelular é considerado o sistema de regulação da flutuabilidade mais eficiente em *Microcystis sp.*, atuando como um lastro ao modificar sua densidade (Reynolds, 1987). De fato, no presente experimento a análise de carboidratos revelou diferenças significativas no acúmulo dessas macromoléculas em células de MiRF-1 entre condição controle e cultivo em material excretado por CyRF-1 na concentração 50%, ao longo do tempo de crescimento (Figura 13).

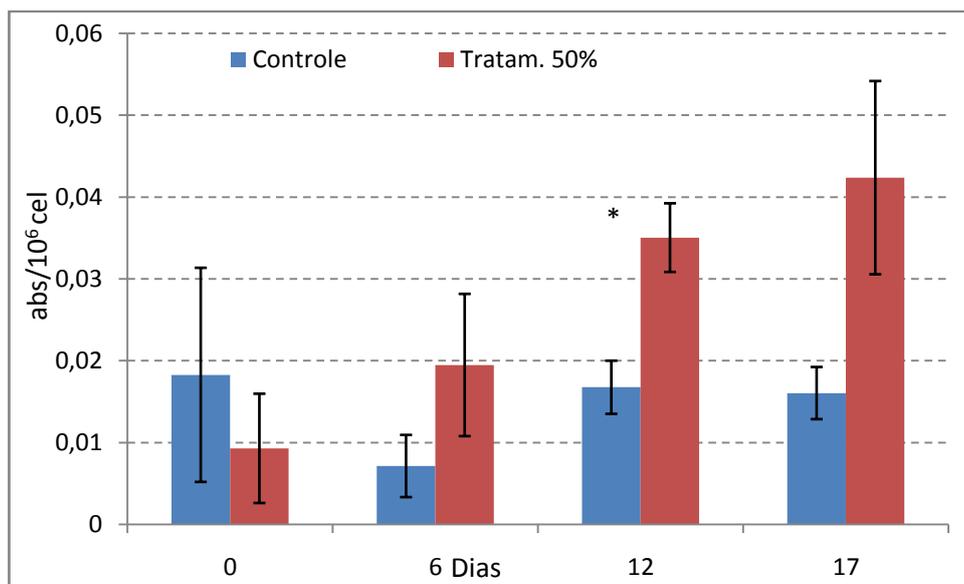


Figura 13. Carboidrato celular (absorbância) em células de MiRF-1 cultivada em meio ASM-1 (controle) e presença de material excretado por CyRF-1 a 50% da concentração original em meio ASM-1 (Tratamento Concentração 50%). (*Diferença sinificativa a uma significância <0,05 – ANOVA).

Enquanto as células cultivadas em meio ASM-1 apresentaram declínio em seu conteúdo de carboidrato durante os primeiros 6 dias de cultivo, confirmando estarem em crescimento exponencial, suas concentrações reatormaram àquelas próximas da inicial, após 12 dias. As células cultivadas em meio enriquecido com material excretado de CyRF-1 demonstraram um contínuo acúmulo dessas macromoléculas, até que, a partir do décimo segundo dia foi possível perceber diferença estatística entre tratamento e controle. Esse resultado parece promissor para o entendimento dos mecanismos relacionados ao menor rendimento apresentado por MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1 na concentração 50%. O acúmulo de carboidratos pode atuar tanto no posicionamento vertical da população na coluna d'água, quanto como um mecanismo de reserva para as células durante períodos em estratos mais profundos, abaixo da zona eufótica, até que fosse consumida ou que se estabelecessem condições favoráveis para o retorno para estratos superiores da massa coluna de água. Essa percepção é

compatível com a ocorrência de menor rendimento e maior sedimentação de MiRF-1 na presença do material excretado por CyRF-1 na concentração 50%.

Apesar disso, não é possível afirmar se a maior quantidade de carboidrato de MiRF-1 na presença do material excretado por CyRF-1 está alocada intracelularmente ou se é apenas consequência de uma maior produção de mucilagem, visivelmente mais presente nas grandes colônias nesse tratamento (Figura 12). Metodologias já descritas (Yang *et al.* 2009), permitem tal diferenciação por realizarem previamente a separação das diferentes frações glicídicas: extracelular dissolvida, extracelular ligada às células e intracelular. Essa técnica já revelou um incremento na produção de ambas as frações extracelulares, dissolvidas e ligadas à células, quando uma cepa de *Microcystis sp.* foi exposta ao material excretado de *Ochromonas sp.*, um flagelado predador capaz de induzir a formação de colônias pela espécie. No entanto, não houve maior produção de carboidrato intracelular (Yang *et al.* 2009).

Polissacarídeos, quando excretados, são os maiores constituintes da mucilagem em procariotos (Brunberg, 1999) e grandes responsáveis pela formação de colônias em *Microcystis aeruginosa*. Kurmayer *et al.* (2003) encontraram correlação positiva entre a produção de microcistinas e tamanho das colônias de *Microcystis sp.*, isoladas do Lago Wansee, Alemanha. É possível, portanto, que uma maior produção de microcistina esteja relacionada à formação de grandes colônias. Quanto à concentração intracelular de microcistinas por MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1 na concentração 50%, já não houve diferença significativa em relação ao controle (Figura 14). Também não foram encontradas diferenças significativas nas quantidades de microcistina extracelular, determinada por imunoenensaio (Figura 15)

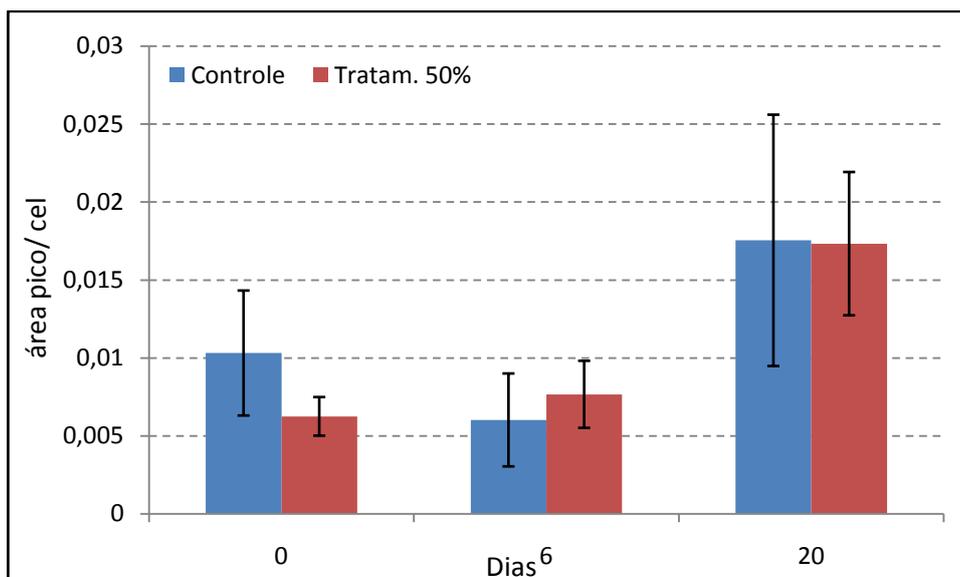


Figura 14. Quantidade relativa de microcistina por célula de MiRF-1 cultivada na condição Controle (ASM-1) e no material excretado por CyRF-1 na concentração 50%, em três tempos amostrais.

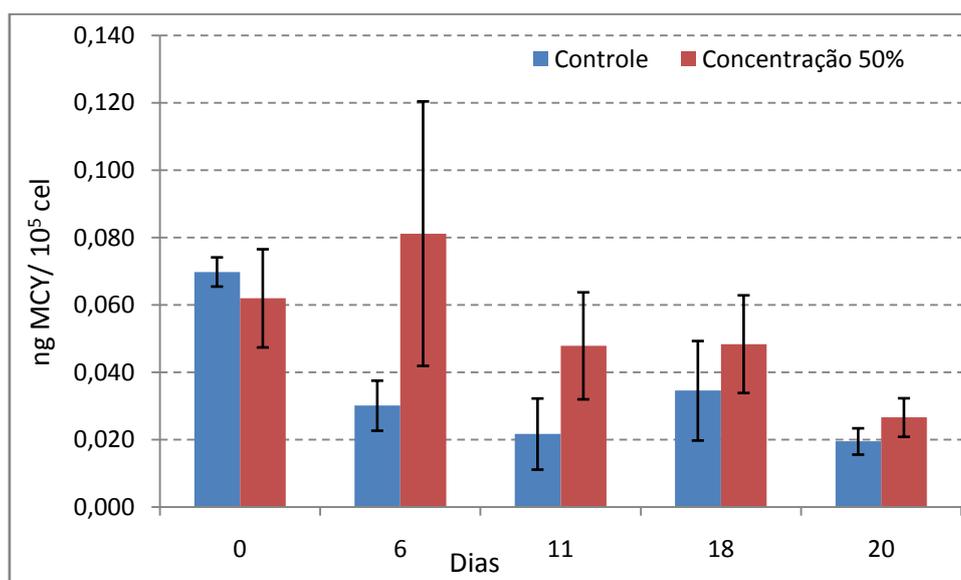


Figura 15. Dosagem de microcistina extracelular em cultivo de MiRF-1 na condição controle (ASM-1) e em material excretado por CyRF-1 na concentração 50% em cinco tempos amostrais, determinado por imunensaio

Quanto à caracterização do perfil de cianopeptídeos produzidos por MiRF-1, a partir das análises realizadas por HPLC não foi possível perceber diferença nem no padrão de cianopeptídeos produzidos nem na concentração intracelular dos mesmos ao se comparar células cultivadas na condição controle e em presença de material

excretado por CyRF-1 diluído a 50%. A baixa resolução e reprodutibilidade dos cromatogramas obtidos precisa ser resolvida, para que os picos que representam possíveis cianopeptídeos possam ser identificados e quantificados. A Figura 16 apresenta alguns desses cromatogramas, exemplificando os problemas encontrados na análise. Algumas regiões do cromatograma, apesar de mal resolvidas, apresentam espectro de absorção semelhante ao de alguns cianopeptídeos não tóxicos, com absorção máxima próxima a 225nm (anabaenopeptinas).

Portanto, entre os parâmetros fisiológicos de MiRF-1 avaliados neste experimento, mostramos que a presença do material excretado por CyRF-1 (concentração 50%) ocasiona menor rendimento, entrada precoce na fase estacionária, formação de agregados e sedimentação, maior número e maior tamanho das colônias e maior acúmulo de carboidratos.

Podemos discutir se a agregação e formação de maiores colônias podem estar relacionadas à entrada precoce de MiRF-1 em fase estacionária, quando cultivada em exsudato de CyRF-1. Hense *et al.* (2007) assinala que a agregação celular atua antecipando respostas disparadas por “quorum sensing”, pois pode resultar na percepção precoce de níveis mínimos dos indutores necessários para desencadear respostas desse tipo.

Segundo Lazazzera (2000), quando bactérias atingem densidades altas, sinalizações intraespecíficas célula-célula, podem ativar a entrada em “uma fase estacionária, que representaria um período quiescente, de não crescimento”. Nesse sentido, as vias de “quorum sensing” convergem com as vias de “starvation sensing”, minimizando as chances de um colapso da população por uma excessiva competição intra-específica. Santos (2009) encontrou fortes evidências de que “quorum starvation” é uma estratégia presente em cultivos de uma cepa de

Microcystis sp.

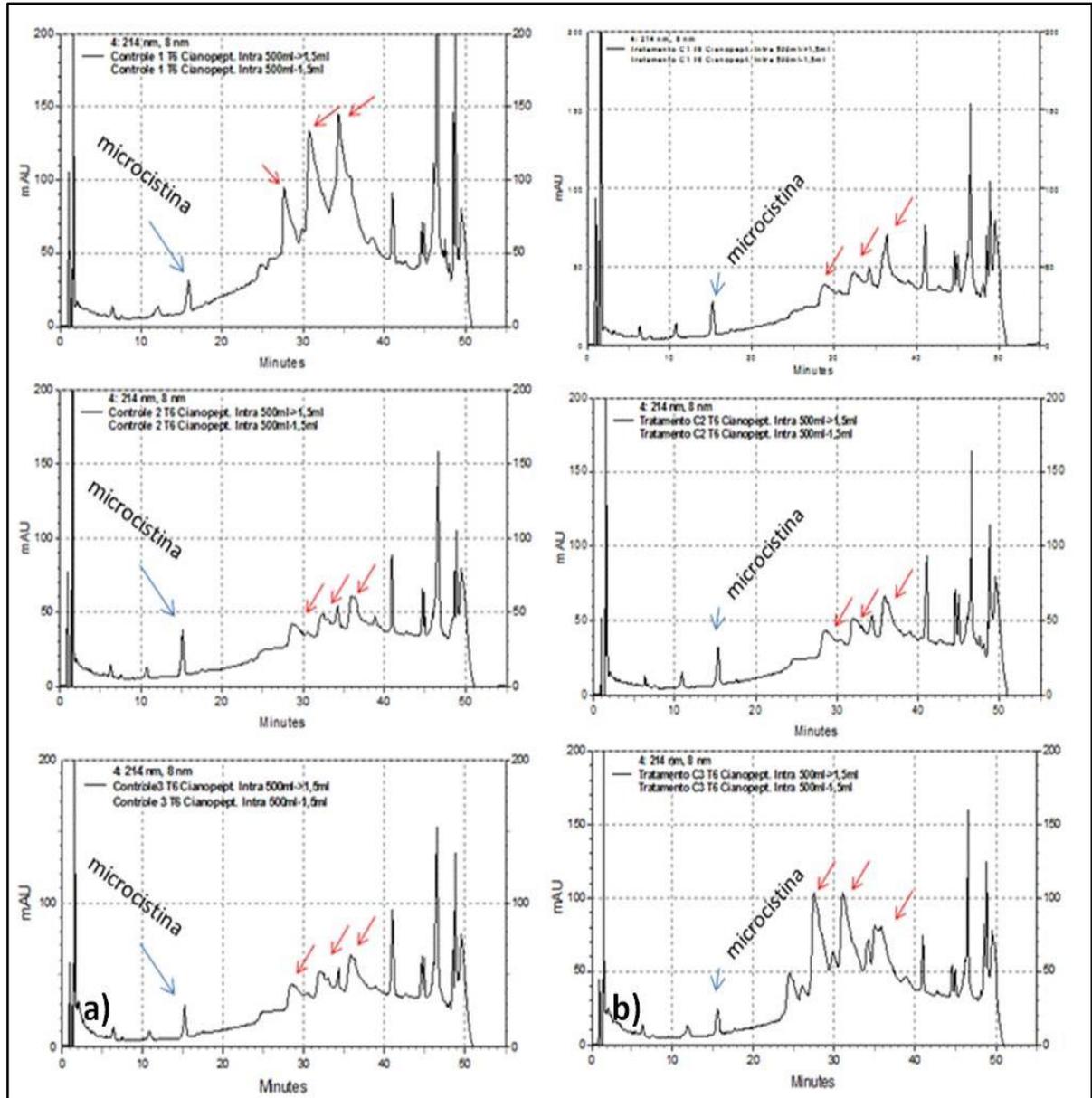


Figura 16. Análise de cianopeptídeos por HPLC. Triplicatas de cromatogramas obtidos de cianopeptídeos de MiRF-1 no sexto dia de cultivo do Experimento I a) Controle b) Material excretado por CyRF-1 a uma concentração de 50%. As setas vermelhas indicam os picos que apresentaram espectro de absorção semelhante ao de cianopeptídeos, com máximo de absorção próximo a 225 nm.

Smayda (1997) estabeleceu relação muito próxima entre rendimento da população e capacidade de suporte do ambiente. Em nosso trabalho, o ambiente foi representado pelo frasco com meio de cultivo e iluminação. Considerando a

padronização das condições nutricionais e de luminosidade, assim como o fato das posições dos balões terem sido constantemente alternadas durante o cultivo, não é possível afirmar que a capacidade de suporte na presença de material excretado por CyRF-1 na concentração 50% fosse menor do que a dos outros tratamentos.

Descartando essa hipótese, restam duas possibilidades que explicariam o menor rendimento, a partir do destino metabólico dos nutrientes contidos no meio de cultivo. Podemos, portanto, supor que o exsudato de CyRF-1 seja capaz de induzir alterações fisiológicas em MiRF-1, direcionando o metabolismo para: 1) Produção de compostos de reserva ou 2) Produção de outros compostos funcionais, em detrimento da divisão celular. As duas situações resultariam em um menor rendimento da cultura. Em outras palavras, a presença de uma espécie competidora (CyRF-1) representaria uma demanda conflitante para MiRF-1, que em detrimento de um maior rendimento, seria induzida a duas possíveis respostas fisiológicas, com sentidos ecológicos distintos e que devem ser investigados. Além disso, não se pode descartar a hipótese de aleloquímicos excretados por CyRF-1 terem afetado sistemas de absorção de nutrientes em MiRF-1. Nesse caso, os oito dias de crescimento normal, em relação ao controle, poderiam ter sido sustentados pelas reservas nutricionais obtidas por gerações anteriores.

A “hipótese 1”, que considera o menor rendimento de MiRF-1 como uma consequência do acúmulo de compostos de reservas, já foi explorada quando se discutiu o acúmulo de carboidratos por MiRF-1 na presença de material excretado por CyRF-1, com consequências possíveis para a fluabilidade das células e formação de colônias. Tais resultados se mostraram bastante positivos e merecem ser aprofundados em estudos próximos.

No entanto, por não serem hipóteses excludentes, deve-se considerar,

também a possibilidade de estarem sendo produzidos outros compostos com funções distintas, às custas do rendimento (hipótese 2). Tais compostos poderiam estar diretamente relacionados à competição. Soares (2008) encontrou efeitos alelopáticos em CyRF-1 apenas quando utilizou o material extracelular proveniente de cultivo misto de MiRF-1 e CyRF-1. Dentre os efeitos encontrados estão menores taxas de crescimento, menores eficiências do Fotossistema II e o clareamento da cultura. Esses resultados sugerem a necessidade de interação prévia entre as cepas, para que haja a produção de aleloquímicos por MiRF-1. No entanto, devido ao fato de a autora ter se utilizado de cultivos mistos para estimular MiRF-1, o trabalho não permite identificar a natureza do estímulo, podendo este ser o próprio contato da cepa com produtos excretados por CyRF-1 ou uma consequência da competição por recursos, sejam luz ou nutrientes disponíveis. Também existe a possibilidade do efeito observado ter sido ocasionado pelo material excretado pela própria CyRF-1 presente no cultivo misto, em um exemplo de “quorum sensing.” Qualquer que seja a natureza do estímulo, a produção de aleloquímicos representa uma demanda metabólica e nesse caso, parte da energia e nutrientes do cultivo, disponíveis para crescimento e duplicação de MiRF-1, seria utilizada para a produção desses compostos, o que acarretaria em densidades celulares menores ao final do cultivo. Como consequência, a fase estacionária seria antecipada, ocasionando em um menor rendimento máximo da cultura.

Por fim é importante ressaltar que os efeitos observados a partir do oitavo dia de cultivo devem ser consequências de uma modificação metabólica anterior

4.2. EXPERIMENTO II: EFEITOS ALELOPÁTICOS DO MATERIAL EXCRETADO POR MiRF-1 (PRODUTORA) SOBRE CyRF-1 (ALVO)

Neste experimento pretendemos comparar os possíveis efeitos alelopáticos do

material excretado por MiRF-1 (Concentração 50%) obtidos em diferentes condições: material excretado de MiRF-1 cultivada em meio ASM-1 (alelopatia), material excretado de MiRF-1 previamente estimulada por material excretado de CyRF-1 (estimulado), material excretado de MiRF-1 em adição de material excretado de CyRF-1 (sinergismo).

O desenho experimental do “Experimento II” foi desenvolvido para ajudar a responder as questões levantadas a partir do “Experimento I”, permitindo verificar se o menor rendimento de MiRF-1 crescendo em exsudato de CyRF-1 se deu devido à produção de um aleloquímico de resposta. Por “aleloquímico de resposta” quer se considerar um potencial aleloquímico produzido apenas após a interação prévia direta com a espécie alvo ou com compostos excretados pela espécie alvo. Além disso, o desenho experimental também fornece subsídios para sugerir a natureza do estímulo necessário, já que considera apenas o estímulo químico, excluindo a influência da competição por recursos.

As curvas de crescimento de CyRF-1 nos diferentes tratamentos do “Experimento II” e na condição controle estão apresentadas na Figura 17 e não mostram nenhuma diferença entre si, o que é confirmado quantitativamente pelos resultados de taxa de crescimento e rendimento máximo (Tabela III). O pequeno aumento no rendimento dos cultivos em material excretado por MiRF-1, mesmo não tendo sido confirmado estatisticamente, pode ser consequência de um incremento de nutrientes provenientes do filtrado celular. Sendo assim, a partir destes dados, não é possível afirmar que o material excretado de MiRF-1 exerça efeito alelopático sobre CyRF-1, nem mesmo se esse material excretado tiver sido obtido de MiRF-1 previamente exposta ao material excretado por CyRF-1 (Estimulado) ou tiver sido misturado ao material excretado por CyRF-1 (Sinergismo). Portanto, não foi

evidenciada a produção de qualquer potencial aleloquímico ou de um “aleloquímico de resposta” por MiRF-1.

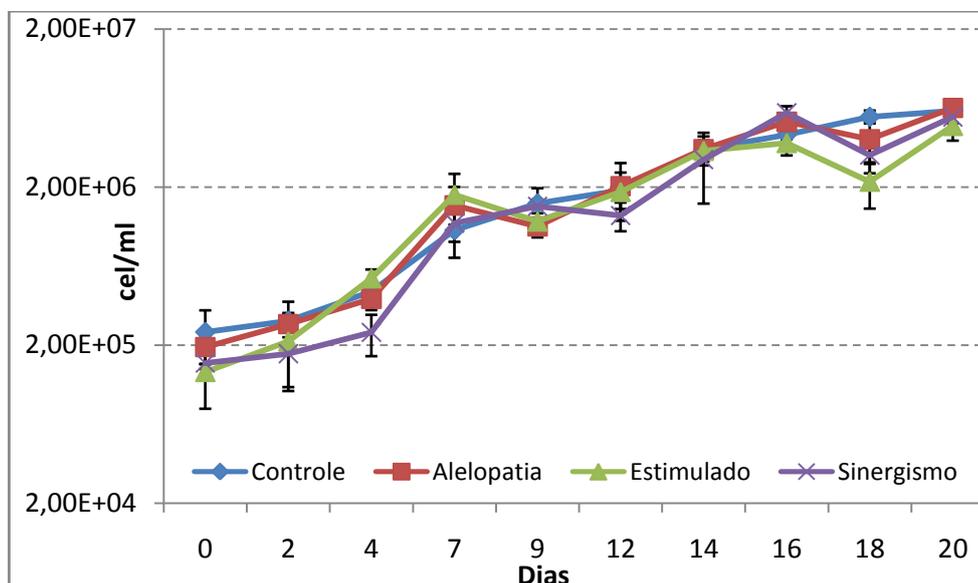


Figura 17 Curva de crescimento de CyRF-1 cultivada em meio ASM-1 (Controle); meio ASM-1 contendo material excretado por MiRF-1 diluído a 50% (alelopatia); em meio ASM-1 contendo material excretado por MiRF-1 que foi estimulada por exsudato de CyRF-1 (Estimulado); em meio ASM-1 material excretado por monoculturas de MiRF-1 diluído a 50% e de CyRF-1 diluído a 25% (Sinergismo).

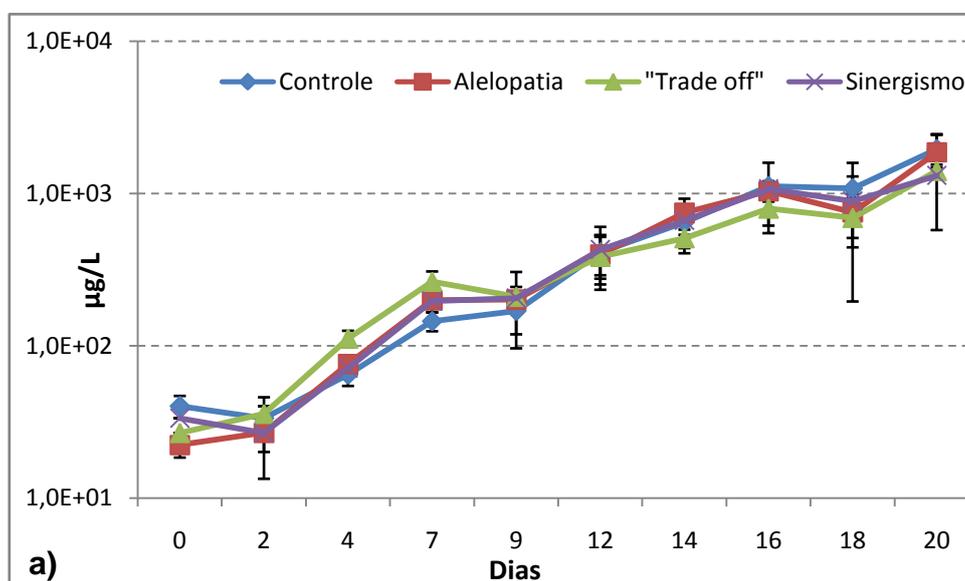
TABELA III - Indicadores do crescimento de CyRF-1 durante o Experimento II

	Velocidade máxima de crescimento (μ)	Rendimento máximo (R)
Controle	0,25	25
Tratamento “alelopatia”	0,27	32
Tratamento “Estimulado”	0,26	36
Tratamento sinergismo	0,28	36

O intenso clareamento das culturas de CyRF-1 cultivada em exsudato retirado de seu cultivo misto com MiRF-1, verificado por Soares (2008), também não foi observado em nosso desenho experimental. A Figura 18 apresenta esse resultado em termos de produção de clorofila-a, que foi semelhante para todos os tratamentos.

O resultado também oferece indícios de que a interação registrada por Soares (2008) tenha sido decorrente da competição por recursos. No entanto, seria necessário repetir o experimento sob as mesmas condições de cultivo utilizadas pela autora, para confirmar esta hipótese. Também existe a possibilidade de que seja necessário o contato célula-célula, mediado por receptores de membrana, para que haja o estímulo (Gross *et al.* 1991; Uchida 2001). Essa questão não foi contemplada pelo presente desenho experimental. Faz-se importante ressaltar que a incubação de MiRF-1 no exsudato de CyRF-1 por 8 dias levou a cepa a reproduzir o mesmo comportamento observado no “Experimento I”, atingindo novamente menores rendimentos e agregamento das células.

Fica claro, portanto, que o menor rendimento de MiRF-1 observado no Experimento I não foi decorrente da demanda conflitante entre maior rendimento e produção de um aleloquímico.



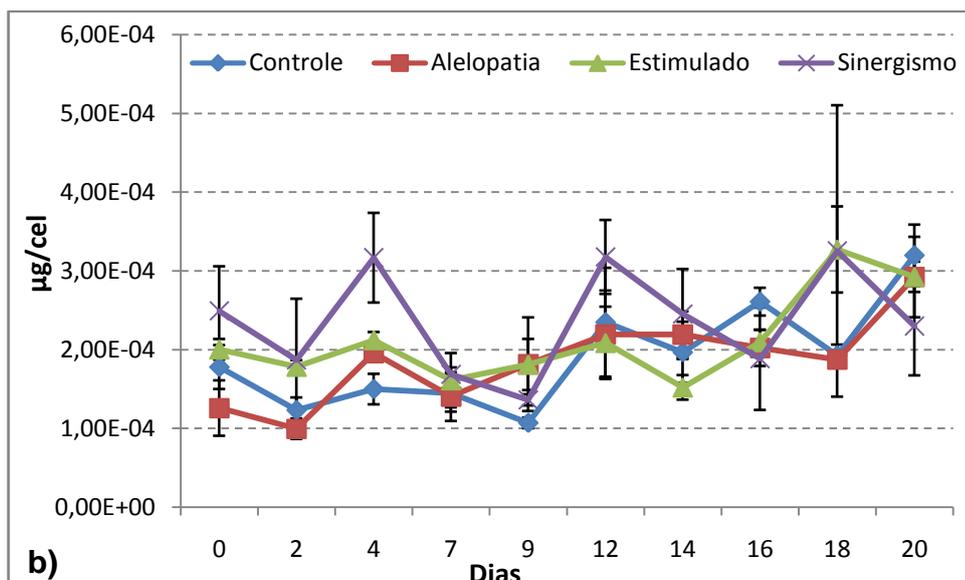


Figura 18 a) Clorofila-a total no cultivo e b) Concentração de Clorofila-a por células de C-yRF-1 crescendo nos diferentes tratamentos do "Experimento II"

Por outro lado, já foi descrita uma interação alelopática entre uma cianobactéria filamentosa e outras espécies fitoplanctônicas em que estas foram induzidas a produzir compostos não alelopáticos. Bar-Yosef *et al.* (2010), demonstrou que cilindrospermopsina é responsável por um incremento na produção de fosfatase alcalina por espécies alvo. Tanto cilindrospermopsina purificada quanto o material excretado da cianobactéria *Aphanizomenon ovalisporum*, foram capazes de induzir maior produção da enzima, por *Chlamydomonas reinhardtii* (clorófitica) e *Debarya sp.*(clorófitica). Como consequência, os autores afirmam que este é um tipo de alelopatia ainda pouco conhecido, no qual um organismo induz a produção de uma enzima relacionada à disponibilidade de nutrientes (ex: fosfatase alcalina) por outras espécies, se aproveitando do benefício compartilhado. As vantagens competitivas unilaterais desse tipo de interação são evidentes e é possível que *C. raciborskii* também as estabeleça. Apesar de CyRF-1 não ser produtora de cilindrospermopsina é possível que outras moléculas atuem como mediadores químicos desse tipo de "escravidão", já que os autores observaram maiores efeitos

induzidos pelo exsudato, em comparação a cianotoxina purificada, o que pode significar um efeito sinérgico ou somatório.

4.3. . UM POSSÍVEL CENÁRIO BASEADO NOS RESULTADOS ENCONTRADOS

Quando cultivadas em condições controle (ASM-1), as taxas de crescimento de MiRF-1 e CyRF-1 apresentam-se bem próximas. No entanto, na presença do material excretado por CyRF-1, MiRF-1 entraria precocemente em fase estacionária, sofrendo um processo de intensa sedimentação. Transpondo isso para o ambiente, uma situação que favorecesse *C. raciborskii* a atingir densidade celular capaz de produzir concentrações suficientes do suposto aleloquímico, resultaria em interrupção do crescimento de *M. aeruginosa* e sua eventual sedimentação. Este cenário poderia ser revertido, quando as condições ambientais se tornassem favoráveis para o retorno de *M. aeruginosa*. Além disso, seria necessário haver um declínio da população de *C. raciborskii* para densidades abaixo daquela capaz de produzir quantidades efetivas de aleloquímicos. No trabalho de Soares et al. (2009), o período de dominância e alta densidade de *C. raciborskii* no Reservatório do Funil terminou com sua substituição por *Anabaena circinalis* e outras espécies, antes de retorno de *M. aeruginosa* à camada superior da coluna d'água.

Tsujimura *et al.* (2000) consideraram a impotência do sedimento do Lago Biwa, Japão, como um estoque de células viáveis para a população local de *Microcystis sp.* Estas seriam recrutadas sob condições ambientais favoráveis e presença de forças de misturas, facilitando o estabelecimento de florações pela espécie. Condições bióticas, como ausência da espécie competidora, não parecem ser um dos possíveis fatores de recrutamento a serem considerados, já que dificilmente seriam percebidas no sedimento. No entanto, pelos nossos resultados, *C. raciborskii* pode ser capaz de auxiliar uma maior sedimentação de células viáveis

de *M. aeruginosa*, estabelecendo um banco denso no fundo do corpo d'água, que representaria um importante inóculo para o próximo evento de floração. A interação descrita poderia, portanto, favorecer uma separação espaço-temporal de nichos entre as duas espécies, favorecendo um aumento na diversidade local, ao ajudar a suprimir a espécie dominante em determinadas épocas do ano (Roy, 2009).

Os resultados encontrados no presente trabalho não estão de acordo com a ação de aleloquímicos aos moldes clássicos. Estes, em sua maioria, interferem nas taxas de crescimento, no aparato fotossintético ou causam lise celular. A ausência de efeitos deletérios e com influências diretas sobre a capacidade reprodutiva da célula alvo sugere a necessidade de interpretações menos restritivas e que permitam a busca por uma melhor compreensão dos contextos evolutivos que favoreçam este tipo de interação. “Escravidão química” e separação de nicho são hipóteses coerentes com os resultados encontrados e devem ser investigadas em maior profundidade.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que:

-Quanto ao cultivo de *M. aeruginosa* (MiRF-1) em material excretado de *C. raciborskii* (CyRF-1):

1. MiRF-1 apresentou respostas fisiológicas ao material excretado por CyRF-1, sugerindo um efeito alelopático do mesmo: menor rendimento, aumento do tamanho e número de colônias, colônias com bainhas mucilaginosas mais espessas, sedimentação e acúmulo de carboidratos.

2. Tais efeitos só foram observados quando MiRF-1 foi cultivada em material excretado de CyRF-1 diluído a 50% e obtido de cultura com densidade de 1×10^6 cel/ml de CyRF-1.

3. A concentração de microcistina intracelular não foi afetada pelo material excretado de CyRF-1, demonstrando que esta não foi a causa direta da agregação da cepa em maiores colônias.

4. O fato do exsudato de CyRF-1 não ter ocasionado alterações na velocidade de crescimento e na produção de clorofila-a sugere não ter danificado MiRF-1 fisiologicamente. Portanto, é possível que as modificações encontradas sobre outras variáveis, como acúmulo de carboidratos e menor rendimento, sejam consequência de uma alteração da regulação fisiológica por MiRF-1, quando em exsudato de CyRF-1. Essa interpretação se aproxima da concepção de alelopatia sinal, à revelia

da visão clássica de alelopatia.

-Quanto ao cultivo de *C. raciborskii* (CyRF-1) em material excretado de MiRF-1:

1. O material excretado de MiRF-1 não exerceu qualquer feito alelopático sobre CyRF-1 nas condições testadas.

2. MiRF-1 não parece ser estimulada a produzir aleloquímicos por contato prévio com o material excretado por CyRF-1, portanto a entrada antecipada de MiRF-1 na fase estacionária induzida por material excretado por CyRF-1 não seria explicada por desvio metabólico a fim de produzir aleloquímicos, mas provavelmente se relaciona a um desvio do metabolismo direcionado à reserva.

- Os resultados encontrados revelam interação química entre CyRF-1 e MiRF-1 que, se expressa no ambiente, pode ter importantes conseqüências sobre a dinâmica de florações no reservatório do Funil.

6. PERSPECTIVAS

Para melhor entendimento dos resultados encontrados e direcionamento para a identificação dos compostos responsáveis pela resposta de MiRF-1 ao exsudato de CyRF-1, são sugeridos alguns objetivos e possíveis estratégias a serem adotadas para atingí-los:

1) Entender as vias metabólicas de MiRF-1 ativadas pelo Exsudato de CyRF-1:

Realização de análises proteômicas (mudanças metabólicas em nível protéico), fluorimétricas (Funcionamento do aparato fotossintético), determinação de ERO (Verificar a potencial participação de estresse oxidativo no processo), fracionamento de carboidratos celular (diferenciar a fração mucilaginosa da fração)

2) Testar efeitos do exsudato sob diferentes condições de cultivo:

Cultivo das cepas produtora e alvo sobre diferentes condições nutricionais e de luminosidade. Também é interessante comparar os cultivos da cepa MiRF-1 em meio composto pela água do reservatório durante baixas densidades da espécie produtora (*C. raciborskii*) e durante um evento de floração da mesma.

3) Otimizar as condições cromatográficas para identificação de cianopeptídeos:

Teste de novos protocolos de pré purificação e de novas proporções entre os eluentes.

4) Verificar o efeito sobre MiRF-1 de diferentes frações do material excretado por CyRF-1:

Separação do material excretado por CyRF-1 de acordo com características moleculares, como polaridade (Cromatografia de troca iônica) ou tamanho (Cromatografia por filtração em gel) e testar seu efeito sobre o cultivo de MiRF-1.

7. REFERÊNCIAS

ARZUL, G., SEGUÉL, M., GUZMAN, L., DEAN, E. E. L. **Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* v. 232, p. 285-295, 1999.

AZEVEDO, S. M. F. O. **Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy** *Journal of Venomous Animals and Toxins.* v. 3, p. 93, 1997.

BAR-YOSEF, Y., SUKENIK, A., HADAS., VINER- MOZZINI, O. Y., KAPLAN, A. **Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum* Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons.** *Current Biology.* v. 20, p. 1-5, 2010.

BRIAND, J.-F., C. LÉBOULANGER, J. F. HUMBERT, C. BERNARD, P. DUFOUR. ***Cylindrospermopsis raciborskii* invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming?** *Journal of Phycology.* v. 40, p. 231–238, 2010.

BRUNBERG, A.K. **Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake.** *FEMS Microbiology Ecology.* v. 29, p. 13-22, 1999.

BURKERT, U., HYESTRAND, P., DRAKARE, S. BLOMQUIST, P. **Effects of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. On colony formation in *Microcystis aeruginosa*.** *Aquatic Ecology.* v. 35, p. 9–17, 2001.

CARMICHAEL, W. W. **The toxins of cyanobacteria.** *Scientific American.* v. 270, p. 64-72, 1994.

CHORUS, I. **The PEPCY Project: Toxic and bioactive peptides in cyanobacteria.** *EU Research Environment and Health – Results from projects funded by the Fifth Framework Programme.* v. 231, p. 220-22, 2006.

CHORUS, I., BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management.** *E & FN Spon /Chapman & Hall, London.* 416 pp, 1999.

CROSSETTI, L. O., & BICUDO, C. E. de M. **Phytoplankton as a monitoring tool in a tropical urban shallow reservoir (Garças Pond): the assemblage index application.** *Hydrobiologia.* v. 610, p. 161–173, 2005.

DOKULIL, M. T. & TEUBNER, K. **Cyanobacterial dominance in lakes.** *Hydrobiologia*. v. 2, p. 1-12, 2000.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBER, P. A., SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Analytical Chemistry*. v. 28, p. 350-356, 2000.

DUDA, R. Z., TARCZYNSKA, M. **The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*.** *Environmental Toxicology*. v. 17, p. 434-440, 2002.

FASTNER, J., ERHARD, M., CARMICHAEL, W.W., SUN, F., RINEHART, K.L., RONICKE, H., CHORUS, I. **Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters.** *Archiv für Hydrobiologie*. v. 145, p. 147–163, 1999.

FERRÃO-FILHO, A. S., SOARES M. C., ROCHA, M. I. A., MAGALHÃES, V. F., AZEVEDO S. M. F. O. **Florações de Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplâncton.** *Oecologia Australis*. v. 13, p. 346-365, 2009.

FERREIRA, A. H. F. **Peptide concentrations in cyanobacteria under different environmental conditions.** *Technische Universität, Berlin*. Tese de doutorado. 146 pp, 2006.

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

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

FISTAROL, G.O., LEGRAND, C., GRANÉLI, E. **Allelopathic effect on a nutrient-limited phytoplankton species.** *Aquatic Microbial Ecology*. v. 41, p. 153-161, 2005.

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

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

GRANÉLI, E., JOHANSSON, N. **Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions.** *Harmful Algae.* v. 2, p. 135–145. 2003.

GRIFFITHS, D. J., & SAKER, M. L. **The Palm Island mystery Disease 20 Years on: A Review of Research on the Cyanotoxin Cylindrospermopsin.** *Environmental Toxicology.* v. 18, p. 78-93. 2002.

GROSS, E. M., C. P. WOLK, C. P., JUTTNER, F. **Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*.** *Journal of Phycology.* v. 27, p. 686–692, 1991.

GROSS, E. M. **Allelopathy of Aquatic Autotrophs.** *Critical Reviews in Plant Science.* v. 22, p.313-319, 2003.

HENSE, B. A., KUTTLER, C., MULLER, J., ROTHBALLER, M., HARTMANN, A. H., KREFT, J.-U. **Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing?** *Nature Reviews Microbiology.* v. 5, p.230–239, 2007.

HU, Z.-Q., LIU, Y.D., LI, D.H. **Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.** *Environmental Toxicology.* v. 19, p. 571–577, 2004

HUSZAR, V. L. M., SILVA, L. H. S., MARINHO, M., DOMINGOS, P. & SANT'ANNA, C. L. **Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters.** *Hydrobiologia.* v. 424, p.67-77, 2005.

IMAI, H., CHANG, K.-H., NAKANO, S.-I. **Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*.** *Journal of Plankton Research.* v. 31, p. 171-178, 2009.

ISHITSUKA, M. O., KUSUMI, T., KAKISAWA, H., KAYA, K. & WATANABE, M. F. **Microviridin, a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium**

Microcystis viridis. Journal of the American Chemical Society. v. 112, p. 8180–8182, 1990.

ITOU, Y., SUZUKI, S., ISHIDA, K. & MURAKAMI, M. **Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595)**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 9, p. 1243–1246, 1999.

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

JONSSON, P. R., PAVIA, H., TOTH, G. **Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.v. 106, p. 11177–11182, 2009.

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

KEATING K.I. **Allelopathic influence on blue-green bloom sequence**. *Science*.v. 196, p.885-7, 1977.

KEHR, J. C. **Characterisation of the lectin microvirin from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and new insights into the role of microcystin**. *Universidade de Berlim*. Tese de doutorado. 149 pp, 2009.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Ettl, H., G. Gardner, G., Heynig, H, Mollenheuer, D., (eds.). *Gustav Fischer, Jena*. v.19, pp. 547, 1999.

KURMAYER, R., CHRISTIANSEN, G., CHORUS, I. **The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee**. *Applied Environmental Microbiology*. v. 69, p. 787, 2003.

LAGOS, N., ZAGATTO, P. A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F.O., OSHIMA, Y. **The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater**

cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. v. 37, p. 1359–1373, 1999.

LAWTON, L. A., GEOFFREY, C. E., CODD, A. **Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters.** *Analyst*. v. 119, p. 1525-1530, 1994.

LAZAZZERA, B. **Quorum-sensing and starvation: signals for entry into stationary phase.** *Current Opinion in Microbiology*. v. 3, p. 177–182, 2000.

LEÃO, P. N., PEREIRA, A. R., LIUC, W.-T., NG, J., PEVZNERD, P. A., DORRESTEIN, P. C., KONIGF, G. M. VASCONCELOS, V. M., GERWICK, W. H. **Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 107, p. 183–1118, 2010.

LEFLAIVE, J., TEN-HAGE, L. **Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins.** *Freshwater Biology*. v. 52, p. 99-214, 2007.

LEWIS, W. M. J. **Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae.** *The American Naturalist*. v. 127, p. 184-194, 1986.

LEGRAND C, RENGEFORS K, FISTAROL, G. O., GRANÉLI, E. **Allelopathy in phytoplankton- biochemical, ecological and evolutionary aspects.** *Phycologia* v. 42, p. 406–419, 2003.

LIPS, I. & LIPS, U. **An analysis of factors controlling the development of cyanobacterial blooms in the Gulf of Finland (Baltic Sea).** *Hydrobiologia*. v. 614, p. 133-140, 2008.

MA, H. **Characterization and lytic activity of allelochemicals produced by the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*.** *Universidade de Bremen. Tese de doutorado*. 149 pp, 2010.

MACKINEY, G. **Absorption of light by chlorophyll solutions.** *The Journal of Biological Chemistry*. v. 140, p. 315-322, 1941.

MANZI, M. M. & AZEVEDO, S. M. F. O. **Influence of N;P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and**

Aulacoseira distans. *Aquatic Ecology*. v. 41, p. 525-533, 2001.

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

MOHAMED, Z. A. **Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: stimulating bloom formation and toxin production by *Oscillatoria agardhii* in some irrigation canals, Egypt**. *Journal of Plankton Research*. v. 24, p. 137–141, 2002.

MULDERIJ, G., SMOLDERS, A. J. P., DONK, E. V. **Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton**. *Freshwater Biology*. v. 51, p. 554-561, 2006.

MYKLESTAD, S., HAUG, A. **Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v. 9, p. 125–136, 1972.

OBERHAUS, L., BRIAN, J. F., HUMBERT, J. F. **Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens***. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 66, p. 243–249, 2008.

OGAWA, T., KAPLAN, A. **Inorganic carbon acquisition systems in cyanobacteria**. *Photosynthesis Research*. v. 77, p. 105–115, 2003.

OKINO, T., MURAKAMI, M., HARAGUCHI, R., MUNEKATA, H., & MATSUDA, H. **Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue green alga *Microcystis aeruginosa***. *Tetrahedron. Letters*. v. 34, p. 8131–8134, 1993.

PADISAK, J. ***Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and a review of its ecology**. *Archives of Hydrobiolo*. v. 107, p. 563-593, 1997.

PADISÁK, J. Phytoplankton. In: O’SULLIVAN, P. E.; REYNOLDS, C. S. (eds) **The Lakes Handbook 1**. Limnology and Limnetic Ecology. *Oxford: Blackwell Science*. pp. 251-308, 2003.

PAERL, H.W. & FULTON III, R.S. **Ecology of Harmful Cyanobacteria.** *Ecological Studies*.v. 128, p. 95-109, 2006.

PAERL, H. W., HALL, N. S., CALANDRINO, S. C. **Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change.** *Science of The Total Environment.* v. 409, p. 1739-1745, 2011.

PFLUGHMACHER, S. **Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems.** *Environmental Toxicology.* v. 7, p. 407- 413, 2002.

RENGEFORS, K. & LEGRAND, C. **Toxicity in *Peridinium aciculiferum*—an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton?** *Limnology and Oceanography.* v. 46, p. 1990-1997, 2001.

REYNOLDS, C. S. **Community organization in the freshwater plankton.** *Symposium of British. Ecology. Society.* v. 27, p. 297–325, 1987.

REYNOLDS, C. S., HUSZAR, V., KRUK, C., NASELI-FLORES, L., MELO, S. **Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton.** *Journal of Plankton Research.* v. 24, p. 417-428, 2002.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation).** *Cambridge: Cambridge University Press.* 1177 pp, 2006.

RIJSSAR, M., ALDERKAMP, A. C., NEJSTGAARD, J. C., SAZHIN, A. F., VERITY, P. G. **Haemolytic activity of live *Phaeocystis pouchetii* during mesocosm blooms,** *Biogeochemistry* v. 83, p.189–200, 2007.

ROY, S. **Do phytoplankton communities evolve through a self-regulatory abundance–diversity relationship?** *BioSystems.* v. 95, p. 160–165, 2009.

SANTOS, M. E. V. **Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis sp.*** *Universidade Federal do Rio de Janeiro.* Dissertação de Mestrado. 86 pp, 2001.

SCHMIDT, L. E., HANSEN, P. J. **Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and**

pH. *Mar Ecol Prog Ser.* v. 216, p. 67-81, 2001.

SEDMAK, B., ELERSEK, T. **Microcystins Induce Morphological and Physiological Changes in Selected Representative Phytoplanktons.**

Microbial Ecology. v. 50, p. 302-305, 2005.

SEDMAK, B., CARMELI, S., ELERSEK, T. **“Non-Toxic” Cyclic Peptides Induce Lysis of Cyanobacteria : An Effective Cell Population Density Control**

Mechanism in Cyanobacterial Blooms. *Microbial Ecology.* v. 56, p. 201–209, 2008.

SCHENEIDER, J. & CAMPION-ALSUMARD, T. **Construction and destruction of carbonates by marine and freshwater cyanobacteria.** *European Journal of Phycology.* v. 34, p. 417-426, 1999.

SMAYDA, T. J. **Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea.** *Limnology and Oceanography* v. 42, p. 1137–1153, 1997.

SOARES, M. C. S. **Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: Uma Batalha Pelágica.** *Universidade Federal do Rio de Janeiro.* Tese de doutorado, 109pp, 2008.

SOARES, M. C. S., ROCHA M. I. A., MARINHO M. M., AZEVEDO S. M. F. O, BRANCO, C.W.C, HUSZAR, V. L. M. **Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects.** *Aquatic Microbiology Ecology.* v. 57, p.137-149, 2009..

SUIKANNEN, S., FISTAROL, G.O., GRANÉLI, E. **Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* v. 308, p. 85-101, 2004.

SUIKANNEN, S., ENGSTROM-OST, J., JOKELA, J., SIVONEN, K, VIITASALO, M. **Allelopathy of Baltic Sea cyanobacteria: no evidence for the role of nodularin.** *Journal of Plankton Research.* v. 28, p. 543–550, 2006.

TSUJIMURA, S, TSUKADA, H. NAKAHARA, H. NAKAJIMA, T., NISHINO, M. **Seasonal variations of Microcystis populations in sediments of Lake Biwa,**

Japan. *Hydrobiologia*. v. 434, p.183–192, 2000.

UCHIDA, T. 2001. **The role of cell contact in the life cycle of some dinoflagellate species.** *Journal of Plankton Research*. v. 23, p. 889–891, 2001.

van RIJSSEL, M., ALDERKAMP, A.-C., NEJSTGAARD, J.C., SAZHIN, A.F., VERITY, P.G. **Haemolytic activity of live *Phaeocystis pouchetii* during mesocosm blooms.** *Biogeochemistry*. v. 83, p. 189–200, 2007.

VIDAL, L., KRUK, C. ***Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes.** *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. v. 3, p.142-151, 2008.

von ELERT, E. & JUTTNER, F. **Phosphom limitation and not light controls the extracellular release of allelopathic compounds by *Trichormus doliolium* (Cyanobacteria).** *Limnology and Oceanography*. v. 42, p. 1796-1802, 1997.

WALLACE, B. B. & HAMILTON, D. P. **The Effect of Variations in Irradiance on Buoyancy Regulation in *Microcystis aeruginosa*.** *Limnology and Oceanography*. v. 44, p. 273-281, 1999.

WELKER, M, DOHREN, H. **Cyanobacterial peptides: Nature's own combinatorial biosynthesis.** *FEMS Microbiol Rev*. v. 30, p. 530-563, 2006.

WILLIS, R.J. **The historical bases of the concept of allelopathy.** *Journal of the History of Biology*. v. 18, p. 71-102, 1985.

WU, Z., SHI J., LI, R. **Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos-aquae*.** *Harmful Algae*.v.8, p. 910-915, 2009.

YANG, Z., KONG, F., SHI, X. CAO H. **Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton.** *Hydrobiologia*. v. 563, p. 225–230, 2006.

YANG, Z., KONG, F. X., YANG, Z., ZHANG, M., YU, Y., QIAN, S. Q. **Benefits and costs of the grazer induced colony formation in *Microcystis aeruginosa*.**

International Journal of Limnology. v. 45, p. 203–208, 2009.

ZHOU, Y. H., YOU, J. K. **Allelochemicals and Photosynthesis**. In: REIGOSA, M. J., PEDROL, N., GONZALEZ, L. (eds.), *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Oxford: *Blackwell Science*. pp. 251-308, 2003.