

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Mariana Mendes e Mello

**O PAPEL DAS INTERAÇÕES QUÍMICAS NA OCORRÊNCIA E DOMINÂNCIA
DE CIANOBACTÉRIAS FORMADORAS DE FLORAÇÕES**

JUIZ DE FORA
2011

Mariana Mendes e Mello

**O papel das interações químicas na ocorrência e dominância de
cianobactérias formadoras de florações**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau
de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação
de Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Soares
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Roland

JUIZ DE FORA
FEVEREIRO DE 2011

Mello, Mariana Mendes e.

O papel das interações químicas na ocorrência e dominância de
cianobactérias formadoras de florações / Mariana Mendes e Mello. –
2011.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia)—Universidade Federal de Juiz de
Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Ecologia vegetal 2. Cianobactérias I. Título.

CDU 581.5

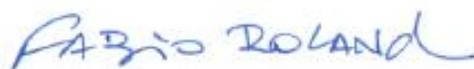
O papel das interações químicas na ocorrência e dominâncias de cianobactérias formadoras de florações.

MARIANA MENDES E MELLO

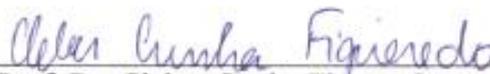
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Carolina Soares

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

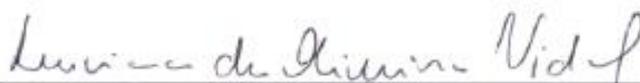
Aprovada em 15 de Fevereiro de 2011.



Prof. Dr. Fábio Roland
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Cleber Cunha Figueredo
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG



Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Vidal
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo apoio, incentivo e suporte. Apoio e incentivo na decisão de continuar estudando por mais dois anos, pela importância que eles sempre deram a um mestrado, com total incentivo quando resolveu fazê-lo, por entenderem as minhas ausências, a porta do quarto o tempo todo fechada e as trocas do dia pela noite. Suporte nos períodos sem bolsa, e por terem permitido que eu fizesse esse mestrado integralmente, sem ter que me preocupar com outras coisas. Por isso tudo, obrigada vó, pai, mãe e tia Nina.

Agradeço aos membros da banca, Dr. Cleber Figueredo e Dra. Luciana Vidal, por terem aceitado esse convite. Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e ao José Carlos.

Obrigada, Fábio, pelas inúmeras e incontáveis oportunidades. Por exigir sempre o “melhor”, e nunca o “bom” de todos nós do laboratório. Obrigada pelos seus momentos de poesia, por mostrar a vida sempre mais bonita do que ela parece. Diferente de você, me falta a poesia necessária para expressar o quão grata sou por fazer parte da sua equipe.

Agradeço à minha orientadora, Carol, que desde que chegou foi muito mais do que uma orientadora. Foi, e é, exemplo e amiga. Obrigada por me apresentar o maravilhoso mundo da alelopatia, pelo qual me embrenhei e me encontrei perdidamente apaixonada. Obrigada pelas discussões, pelos conselhos, pelo seu tempo comigo, pelas risadas e por ser uma excelente orientadora. Meu crescimento científico, tenho certeza, entrou em fase exponencial desde que você chegou no LEA, há três anos atrás. Muito obrigada!

Thank you, Miquel, for opening the doors of the Plankton Laboratory, at Wageningen University and Research Centre, where I did the bioassays of the second chapter of this thesis and where I spent a really wonderful time. Thank you for the ideas and all support you gave me. Thank you Bê, Wendy, John, Els, Dennis, Hiel and Frank for helping me during my lost moments at the lab.

Agradeço à Maíra, pelo interesse nas algas, em aprender, pela ajuda nos experimentos, pela enorme competência e responsabilidade. Os quais nos permitiram desenvolver uma excelente parceria. Não poderia ser melhor.

Obrigada, Papel, por estar à frente da nossa jornada pelo Manacás. Trabalho que não faz parte dessa dissertação mas que vem sendo desenvolvido no mesmo período e pelo qual tenho imenso carinho. E, claro, obrigada por ser responsável pelos incontáveis momentos de diversão.

Obrigada, Simone, pela revisão, pelos comentários e companheirismo.

Obrigada aos demais amigos do LEA (Lúcia, Natália, Nathan, Raquel, Luciana, Gladson, Caique, Rafael A., Guilhermino, Anderson, Fran, Michele, Fernanda, Tabatha, Felipe P., Felipe R., Marcela, Guizão, Malafaia) pelos cafés e almoços juntos, pelas conversas, por dividirmos medos e alegrias, e por fazerem com que a gente se sinta verdadeiramente em casa estando aqui.

Obrigada, Fernanda, pela total presença durante esse tempo. Pelas pelos passeios, pelas saídas, pelas sanduiches, pelas conversas, pelo apoio, pelas broncas e por entender os momentos de ausência. Obrigada por sempre me deixar saber que teria você ao meu lado. Isso faz uma grande diferença.

Obrigada aos demais amigos e familiares (pequeno exemplo: Eponina, vó Nivalda, Roberta, Bianca, Patrick.....) que sempre incentivaram, perguntando por notícias do mestrado e mandando boas energias.

Obrigada ao Amabis, autor do livro de biologia no qual, ainda no colégio, li pela primeira vez sobre florações de cianobactérias, o suficiente para me apaixonar.

Por fim, mas não menos importante, obrigada, Alessandro, por todo esse tempo ao meu lado. Por me ouvir falar do trabalho 500 vezes ao dia, e melhor, por se interessar por ele! Obrigada pelas revisões, pelas discussões enriquecedoras, pela sua visão microbiológica. Obrigada por suportar meu período totalmente razão e quase nada coração (já passou..).

“If you cannot beat them or eat them, just kill
them by chemical weapons”

(Urban Tilmann, 2003)

RESUMO

Cianobactérias vêm sendo apontadas como um dos maiores problemas ambientais relacionados à água doce. Esses micro-organismos formadores de florações e potencialmente tóxicos estão relacionados à perda da qualidade da água e até a problemas de saúde em seres humanos. Alta afinidade por nitrogênio, estratégias para estocagem de fósforo e a capacidade de ajustarem sua posição na coluna d'água são algumas vantagens competitivas das cianobactérias sobre outros componentes do fitoplâncton. Mais recentemente, a ocorrência de processos de comunicação química, como alelopatia e *quorum sensing*, vêm sendo apontados como vantagens competitivas alternativas das cianobactérias. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: (1) verificar se as espécies *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* interagem quimicamente e se situações de estresse por competição e luz influenciam nessa interação; (2) verificar como a competição entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* pode alterar a morfologia de *M. aeruginosa*, através da formação de colônias, além de avaliar o papel da co-evolução neste processo. Para tal, experimentos em laboratório foram executados adicionando-se exudatos de culturas de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, sob diferentes condições, em ambas as espécies como alvo. Os resultados apontaram que as cepas de *C. raciborskii* (CYRF) e *M. aeruginosa* (MIRF) provenientes do Reservatório do Funil (RJ) apresentaram um maior número de respostas às interações químicas do que cepas provenientes de outros locais. CYRF em estresse por competição produziu possíveis aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de MIRF, enquanto MIRF quando cultivada sob estresse por luz ($25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) produziu aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de CYRF. Ambas as cepas também demonstraram a habilidade de se comunicarem por *quorum sensing*. Essa comunicação em CYRF induziu a inibição do seu próprio crescimento, enquanto que em MIRF induziu a formação de colônias. Quando a formação de colônia em *M. aeruginosa* foi testada, foi observado uma possível produção de moléculas para a formação de colônias em MIRF engatilhada pela competição com diferentes cepas de *C. raciborskii*, e não somente com CYRF. Os resultados apontaram também que, dentre dez cepas de *M. aeruginosa* testadas, somente MIRF foi capaz de formar colônias quando em contato com o exudato da competição entre CYRF e MIRF. Desta forma, o sinal para formação de colônia foi apontado como cepa-dependente, indicando a importância do papel da co-evolução nas interações químicas entre cianobactérias. Os resultados encontrados sugerem que interações químicas intra e interespecíficas podem desempenhar importante

papel, ainda que pouco explorado, na dominância e substituição de espécies de cianobactérias.

Palavras-chave: alelopatia, *quorum sensing*, *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, competição, luz.

ABSTRACT

The role of chemical interactions in occurrence and dominance of bloom forming cyanobacteria

Cyanobacteria have been pointed as one of the main problems in freshwater systems. These blooming microorganisms are potentially toxic and their occurrence have been directly related to the lost of water quality and human health problems. High nitrogen affinity, strategies to storage phosphorus and the ability to adjust their position in the water column are some competitive advantages of cyanobacteria over other phytoplankton components. Recently, mechanisms of chemical communication, such as allelopathy and *quorum sensing*, have been indicated as an alternative advantage of cyanobacteria. The aim of this study was: 1. to evaluate if *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* can interact chemically, and if stressed conditions caused by competition and light can interfere in this relationship; 2. to evaluate how the competition between *C. raciborskii* and *M. aeruginosa* can induce morphological variation (colony formation) in *M. aeruginosa* and how the role of co-evaluation. Laboratory experiments were performed and exudates from *C. raciborskii* and *M. aeruginosa*, cultivated in different conditions, were added to the same species as target. The results revealed that the strains of *C. raciborskii* (CYRF) and *M. aeruginosa* (MIRF), isolated from Funil Reservoir (RJ), showed more responses to chemical interactions than the strains from different places. When CYRF was grown in regular light ($100 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and stressed by competition, this strain produced allelochemicals that inhibited the growth of MIRF, while MIRF cultivated in light stress ($25 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) produced allelochemicals that inhibited the growth of CYRF. It was also observed that both strains have the ability to communicate by *quorum sensing*. This communication induced growth self-inhibition in CYRF, while it induced colony formation in MIRF. When colony formation was evaluated, the production of inducible molecules to colony formation in MIRF was triggered by the competition with different strains of *C. raciborskii*, and not only by the competition with CYRF. The results also showed that, among ten strains of *M. aeruginosa*, only MIRF was able to form colonies when in contact with exudates from competition between CYRF and MIRF. The colony formation signal was pointed as strain-dependent, highlighting the importance of the co-evolution in chemical interactions among cyanobacteria. These results suggest that chemical interactions among species can play an important role, still unexplored, in the dominance and successional pattern of species.

Keywords: allelopathy, *quorum sensing*, secondary metabolites, *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, competition, light.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 – FATORES PROMOTORES DE INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE CIANOBACTÉRIAS	21
ASPECTOS TEÓRICOS, OBJETIVOS E HIPÓTESES	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
Culturas	23
Experimentos	23
1. <i>Competição como fator de estresse</i>	23
2. <i>Luz como fator de estresse</i>	25
Análise dos dados	26
RESULTADOS	27
1. <i>Competição como fator de estresse</i>	27
2. <i>Luz como fator de estresse</i>	31
DISCUSSÃO	34
1. <i>Competição como fator de estresse</i>	34
2. <i>Luz como fator de estresse</i>	38
CONCLUSÃO	42
CAPÍTULO 2 - COMPETIÇÃO ENTRE CIANOBACTÉRIAS COMO FATOR INDUTOR DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	44
ASPECTOS TEÓRICOS, OBJETIVOS E HIPÓTESES	45
MATERIAIS E MÉTODOS	46
Culturas	46
Experimentos	47
1. <i>Efeito de diferentes cepas de <i>C. raciborskii</i> na formação de colônia em MIRF</i>	47
2. <i>Efeito do exudato de CYRF e MIRF na formação de colônias em diferentes cepas de <i>M. aeruginosa</i></i>	48
Análise dos dados	49
RESULTADOS	50
1. <i>Efeito de diferentes cepas de <i>C. raciborskii</i> na formação de colônia em MIRF</i>	50
2. <i>Efeito do exudato de CYRF e MIRF na formação de colônias em diferentes cepas de <i>M. aeruginosa</i></i>	52
DISCUSSÃO	55

1. Efeito de diferentes cepas de <i>C. raciborskii</i> na formação de colônia em MIRF.....	55
2. Efeito do exudato de CYRF e MIRF na formação de colônias em diferentes cepas de <i>M. aeruginosa</i>	57
CONCLUSÃO.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Introdução geral

INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias são organismos unicelulares, coloniais ou filamentosos, procariotos e autotróficos fotossintetizantes (REYNOLDS, 2006). Estes micro-organismos são considerados os mais antigos produtores de oxigênio na superfície da Terra (SCHOPF, 2000). Juntamente com outras microalgas, as cianobactérias são importantes componentes do fitoplâncton, contribuindo com grande parte da produtividade primária nos ecossistemas aquáticos. Alguns grupos de cianobactérias são capazes de produzir diversos metabólitos secundários com atividade biológica, como uma vasta gama de toxinas potentes, chamadas cianotoxinas, que podem afetar a biota dos sistemas em que vivem. Contudo, a função ecológica dessas toxinas ainda não está clara (CARMICHAEL, 1992; KAEBERNICK e NEILAN, 2001; SCHATZ et al., 2007; CAMACHO, 2008).

A proliferação excessiva desses micro-organismos é denominada floração. As cianobactérias formadoras de florações representam hoje um dos mais graves problemas nos sistemas de água doce do mundo. Florações de cianobactérias estão, na maioria dos casos, diretamente relacionadas com mudanças ambientais causadas pelo homem, como a eutrofização artificial de ambientes aquáticos (enriquecimento excessivo do ambiente com nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio) (BOUVY et al., 2000; AZEVEDO et al., 2008). Sua proliferação excessiva pode levar à perda da qualidade da água (alterações no seu odor e sabor), mudanças na cadeia trófica, perda de diversidade, mortandade de peixes e animais domésticos e até problemas de saúde relacionados aos seres humanos (CARMICHAEL et al., 2001; PAERL et al., 2001; PAERL e HUISMAN, 2009). Ao estudar a ecologia de cianobactérias, busca-se obter ferramentas para a melhor compreensão da ocorrência desses organismos, assim como fatores chave para o entendimento e manejo de florações.

Algumas características como alta afinidade por nitrogênio (SMITH, 1983; BLOMQUIST et al., 1994), estratégias para estocagem de fósforo (PETTERSON et al., 1993) e a capacidade de ajustarem sua posição na coluna d'água por meio de aerótopos (REYNOLDS et al., 1987; BORMANS et al., 1999) são consideradas vantagens competitivas das cianobactérias sobre outros componentes do fitoplâncton. Essas vantagens são apontadas como fatores relacionados com as florações de cianobactérias, embora diversas variáveis bióticas e abióticas geralmente atuem em sinergia. Mais recentemente, a comunicação química entre esses micro-organismos vem sendo apontada como uma vantagem alternativa para as cianobactérias formadoras de florações (FIGUEREDO et al., 2007; SHARIF et al., 2008). Dentre os

processos de comunicação química entre micro-organismos, alelopatia e *quorum sensing* têm recebido especial atenção, e ambos são mediados pela produção de metabólitos secundários (IAS, 1996; WATERS e BASSLER, 2005). As cianobactérias têm sido identificadas como um importante grupo produtor de metabólitos secundários bioativos (SINGH et al., 2005), embora seu papel ecológico e mecanismos relacionados com sua produção sejam ainda pouco abordados. Mais de 550 metabólitos secundários de cianobactérias foram relatados, dos quais muitos apresentaram bioatividade (TAN, 2007). As cianotoxinas são o mais importante grupo de metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e vêm sendo extensivamente estudadas nos últimos 20 anos devido ao risco que oferecem à saúde humana (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007). Entretanto, dentre os compostos metabólicos secundários produzidos por cianobactérias, bem menos estudados do que as cianotoxinas, estão os compostos não-tóxicos com possível atividade antibiótica (WELKER et al., 2004; LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007). Esses compostos foram classificados por LEFLAIVE e TEN-HAGE (2007) como compostos alelopáticos e juntamente com as toxinas foram chamados de compostos aleloquímicos. Nesse trabalho, o efeito de compostos alelopáticos e cianotoxinas foram confrontados e apontou-se que, em muitos estudos, o efeito de toxinas purificadas sobre outros organismos só é observado quando concentrações acima dos limites geralmente encontrados no ambiente são utilizadas, sendo essa uma das razões de diversos autores excluírem a hipótese de um papel alelopático das cianotoxinas. Além disso, foi relatado por LEFLAIVE e TEN-HAGE (2007) que extratos celulares contendo toxinas e compostos alelopáticos são usualmente mais tóxicos do que toxinas purificadas.

A alelopatia é caracterizada como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e desenvolvimento de outro sistema biológico (IAS, 1996). Processos alelopáticos em sistemas terrestres são mais comuns e melhor compreendidos do que em sistemas aquáticos. Embora o papel da alelopatia em sistemas aquáticos seja ainda pouco compreendido e estudos sobre o efeito dessas interações entre cianobactérias sejam ainda escassos (LEGRAND et al., 2003), aleloquímicos têm sido apontados por desempenhar um importante papel na variabilidade planctônica, competição e formação de florações (RENGEFORS e LEGRAND, 2001; GROSS, 2003; FIGUEREDO et al., 2007). Em um trabalho pioneiro, KEATING (1977) apontou a alelopatia como fator para explicar a sequência de florações de cianobactérias no Lago Linsley, em que filtrados de culturas das espécies dominantes inibiram o crescimento das espécies precursoras das florações. De maneira semelhante, efeitos

alelopáticos de cianobactérias foram apontados como fator de contribuição para a dominância de cianobactérias do lago Neusiedlersee (SCHAGERL et al., 2002), no qual o método de difusão em placa foi utilizado e apontou forte efeito alelopático da cianobactéria *Nostoc muscorum* sobre o crescimento de outras cianobactérias e microalgas. SUIKANNEN et al. (2004, 2005, 2006) também desenvolveram estudos sobre o papel da alelopatia na dominância de cianobactérias no mar Báltico. No primeiro estudo, os autores relataram os efeitos inibidores de filtrados provenientes de culturas das espécies de cianobactérias provenientes do mar Báltico (*Anabaena lemmermanni*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Nodularia spumigena*) sobre o crescimento de microalgas coexistentes. Já no trabalho mais recente, os autores mostraram que o efeito alelopático das culturas de *A. flos-aquae* e *N. spumigena* não foi relacionado à toxina purificada nodularina, mas sim ao filtrado utilizado, não atribuindo os efeitos de inibição às cianotoxinas. O efeito de metabólitos secundários de cianobactérias em outras cianobactérias e microalgas também foram reportados por PUSHPARAJ et al. (1998), SCHLEGEL et al. (1998), GANTAR et al. (2008), OBERHAUS et al. (2008) e LEÃO et al. (2009). Na maioria dos trabalhos, os efeitos dos metabólitos secundários foram a inibição da fotossíntese e do crescimento das espécies alvo. Contudo, além de efeitos diretos no crescimento de outras algas, metabólitos produzidos pela cianobactéria *Anabaena flos-aquae* causaram paralisia na alga verde *Chlamydomonas* (KEARNS e HUNTER, 2001). Em PUSHPARAJ (1998), extrações de biomassa da cianobactéria *Nodularia harveyana* em acetona foram realizadas para obtenção de metabólitos secundários e, além do efeito em outros componentes do fitoplâncton, foi relatada ação antibiótica em bactérias, fungos, rotíferos e crustáceos. Efeitos de metabólitos secundários de cianobactérias sobre macrófitas também já foram descritos, e indicaram a inibição do crescimento da macrófita *Lemna gibba* pelo metabólito secundário cianobacterina (GLEASON e CASE, 1986) e da angiosperma aquática *Spirodela polyrhiza* por antibióticos provenientes de *Oscillatoria* sp. (CHAUHAN et al., 1992). Como descrito, aleloquímicos de cianobactérias podem causar efeitos diretos sobre seus potenciais competidores, como a diminuição da eficiência fotossintética ou morte e/ou exclusão da vizinhança (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007). Embora esses sejam os efeitos mais comumente reportados, mudanças na morfologia de organismos fitoplanctônicos como resultado do efeito de aleloquímicos de um competidor fotoautotrófico foram reportadas recentemente (MULDERIJ et al., 2005; LEFLAIVE et al., 2008). Dados da literatura vêm mostrando que o efeito de metabólitos secundários em predadores e competidores, entretanto, estão muito relacionados com o organismo alvo, e os resultados não podem ser generalizados (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007).

Quorum sensing é um mecanismo de comunicação química célula-a-célula utilizado por micro-organismos emediado por moléculas auto-indutoras (metabólitos secundários), agindo sobre os organismos produtores quando a densidade populacional destes se é aumentada (READING e SPERANDIO, 2006; STRAIGHT & KOLTER, 2009). Esse processo desempenha função central na fisiologia e desenvolvimento dos micro-organismos (WATERS e BASSLER, 2005), e já foi relatado como responsável por coordenar diversas funções em populações de bactérias (STRAIGHT e KOLTER, 2009), como por exemplo: sinalizar o crescimento exponencial conjunto de populações (FEDERLE e BASSLER, 2003), induzir a expressão de genes para bioluminescência em *Vibrio fischeri* (NEALSON e HASTINGS, 1979) e alterar a morfologia celular de *Myxococcus xanthus*, produzindo corpos de frutificação (DWORKIN, 1963). A comunicação por *quorum sensing* é um mecanismo bem descrito para bactérias, em que as moléculas envolvidas e seu papel na ecologia dos micro-organismos produtores é conhecido (STRAIGHT e KOLTER, 2009). Para cianobactérias, entretanto, pouco é conhecido sobre esse mecanismo. Sabe-se que o sinal de *quorum sensing* mais extensivamente estudado, a molécula N-acil-homoserina lactonas (AHLs), foi detectado em culturas axênicas da cianobactéria *Gloeothoece* (SHARIF et al., 2008). A acumulação de AHLs também foi detectada na biomassa da cianobactéria *Anabaena* sp. (ROMERO et al., 2008). Nesse estudo, maior quantidade de AHLs foi encontrada durante a fase exponencial do crescimento de *Anabaena* sp., desaparecendo abruptamente no começo da fase estacionária. Em ambos os estudos, a função e contexto ecológico da molécula sinalizadora de *quorum sensing*, entretanto, não foram esclarecidos.

A produção de aleloquímicos pode ser afetada por uma série de fatores (LEGRAND et al., 2003). A quantidade de compostos alelopáticos liberados pode ser dependente da densidade da alga produtora e do pH (SCHMIDT e HANSEN, 2001), da temperatura e da luz (GRANÉLI e SALOMON, 2010). Para certas espécies de microalgas, compostos alelopáticos somente são produzidos e excretados no meio quando as células se encontram sob algum estresse, como por nutrientes (GRANÉLI e JOHANSSON, 2003), salinidade e luz (GRANÉLI e SALOMON, 2010). Mesmo em espécies onde a produção de aleloquímicos é iniciada sem a ação de algum estresse, a quantidade de aleloquímicos produzidos pode aumentar muitas vezes sob essas condições (GRANÉLI e SALOMON, 2010). Com relação aos fatores que podem influenciar a produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*, sabe-se que a sobrevivência de uma população de micro-organismos está relacionada à capacidade de responder às mudanças ambientais, adaptando-se ao ambiente (STRAIGHT e

KOLTER, 2009). Os mesmos autores afirmam que essa capacidade de responder conjuntamente a mudanças ambientais é dada por moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*. Desta forma, a produção de moléculas de *quorum sensing* pode ser influenciada por mudanças ambientais significativas para a população em questão.

No Brasil, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* estão entre os gêneros de cianobactérias formadores de florações mais comuns (HUSZAR e DA SILVA, 1999). *Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria filamentosa, com capacidade de fixar nitrogênio em células especializadas (heterócitos), presença de células de resistência (acinetos) e elevada afinidade por fósforo (PADISÁK, 1997) (Fig. 1). Na última década, houve um aumento no interesse da compreensão da ecologia e dos fatores promotores da ocorrência de *C. raciborskii*. Isso se deu devido a elucidação do seu potencial de produzir toxinas, formar florações, e pela sua rápida expansão geográfica reportada pelo aumento do número de relatos de sua ocorrência em ecossistemas continentais de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (PADISÁK, 1997; BRIAND et al., 2002). *C. raciborskii* vem sendo descrita como espécie com baixo requerimento por luz (PADISÁK, 1997), com capacidade de se adaptar a ambientes com baixa disponibilidade luminosa (BOUVY et al., 2000). O crescimento ótimo para essa espécie foi registrado a intensidades luminosas mais baixas (por volta de $400 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) quando comparado com o crescimento da mesma a intensidades luminosas mais altas (por volta de $2000 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (SOARE, et al., 2009). Já para a espécie *Microcystis aeruginosa*, os mesmos autores relataram formação de florações a condições luminosas mais elevadas (por volta de $2000 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Além disso, a capacidade de se ajustar na coluna d'água por meio de

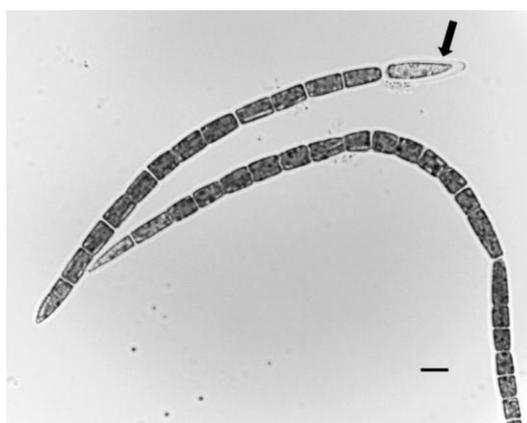


Figura 1. Filamentos de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Seta indica heterócito

aerótopos (REYNOLDS et al., 1987; BORMANS et al., 1999) e a habilidade de provocar auto-sombreamento evitando assim a fotoinibição (ROBARTS e ZOHARY, 1984) podem ser vantagens competitivas de *M. aeruginosa* com relação à variável luz. *M. aeruginosa* é uma cianobactéria colonial capaz de formar colônias flutuantes, usualmente microscópicas, apresentando fina camada de mucilagem e alta densidade de células (KOMÁREK et al., 2002) (Fig. 2). A espécie

existe principalmente sob forma colonial em condições naturais e como células

isoladas quando cultivada sob condições controladas em laboratório (BOLCH e BLACKBURN, 1996). Essa mudança na morfologia sugere que fatores responsáveis pela forma colonial típica estão ausentes nos meios de cultura e presentes em ambientes naturais.

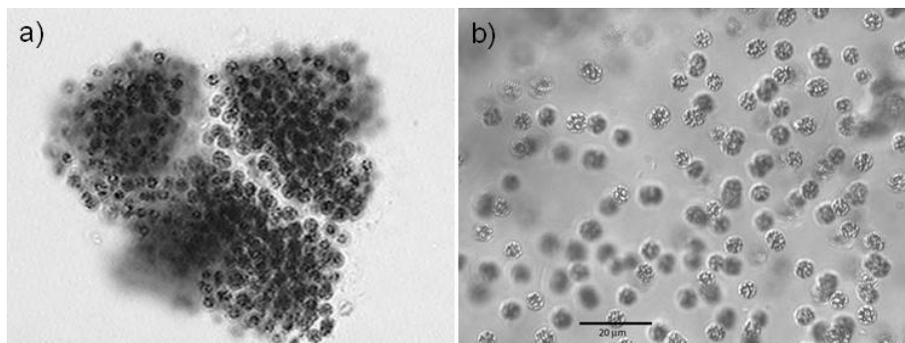


Figura 2. Colônias (a) e células isoladas (b) de *Microcystis aeruginosa*

Alelopatia foi uma das razões para explicar o sucesso de *C. raciborskii* em Lagoa Santa, localizada no cerrado brasileiro (FIGUEREDO et al., 2007). Os autores realizaram experimentos utilizando exudatos do fitoplâncton natural da lagoa em que *C. raciborskii* vem dominando nas últimas décadas e de linhagens isoladas de *C. raciborskii*. Os exudatos foram adicionados a diferentes espécies, as quais apresentaram fortes efeitos de inibição em suas atividades fotossintéticas. A capacidade alelopática também foi reportada para *M. aeruginosa* (SINGH et al., 2001), em que a inibição do crescimento de algas verdes e cianobactérias foi relatada quando estas entraram em contato com extrato aquoso bruto de floração de *Microcystis*. Microcistinas, uma das principais cianotoxinas produzidas por *M. aeruginosa* (CARMICHAEL, 1992), também já foram relatadas com atividades alelopáticas sobre macrófitas, induzindo a inibição do crescimento, diminuição na produção de oxigênio e mudanças no padrão de pigmentação da macrófita (PFLUGMACHER, 2002). A capacidade de se comunicar por *quorum sensing* ainda não foi reportada para o gênero *Cylindrospermopsis*. Para *Microcystis*, no entanto, foi sugerida a produção de um sinal ainda desconhecido, como a capacidade de interferir na divisão celular dos organismos produtores, resultando em inibição do crescimento e tendência à agregação celular (SANTOS, 2009).

As espécies *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* são as principais cianobactérias que ocorrem no Reservatório do Funil (RJ – Brasil). Este é um sistema eutrófico com intensas florações de cianobactérias: enquanto *M. aeruginosa* aflora nos meses de verão, *C. raciborskii* é a principal espécie ao longo do ano (SOARES et al., 2009). Desta forma, o objetivo geral do presente trabalho foi buscar compreender se as

interações químicas podem desempenhar algum papel na dominância e substituição de cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil. A hipótese é que além das variáveis tradicionalmente apontadas como direcionadoras da ocorrência de cianobactérias, alelopatia e *quorum sensing* podem ser mais um mecanismo envolvido nas complexas interações que ocorrem entre esses micro-organismos. Para tal, experimentos em laboratório foram realizados com os seguintes objetivos específicos: (1) verificar se as espécies *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* interagem quimicamente e se situações de estresse por competição e luz influenciam nessa interação; (2) verificar como a competição entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* pode alterar a morfologia de *M. aeruginosa*, afetando a formação de colônias, além de avaliar o papel da co-evolução neste processo. Esses objetivos foram divididos em dois capítulos que serão apresentados neste estudo.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

FATORES PROMOTORES DE INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE CIANOBACTÉRIAS

ASPECTOS TEÓRICOS, OBJETIVOS E HIPÓTESES

Como descrito anteriormente, muitos fatores podem afetar a produção de metabólitos secundários. Com relação à densidade dos organismos nas interações químicas, a força do efeito de metabólitos secundários na espécie alvo é dependente da densidade tanto da espécie produtora, quanto da espécie alvo; em que maior densidade da espécie produtora resulta em efeitos mais expressivos, e maior densidade da espécie alvo resulta em efeitos menos expressivos (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2009; STRAIGHT e KOLTER, 2009). Com relação à luz, resultados contraditórios têm sido observados. Tanto baixas intensidades luminosas (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2009; GRANÉLI e SALOMON, 2010) quanto altas (WIEDNER et al., 2003; DYBLE et al., 2006) já foram registradas como relacionadas ao aumento da produção de metabólitos secundários. Além disso, a produção desses metabólitos pela microalga *Prymnesium parvum* foi descrita como não dependente da luz (RAHAT e JAHN, 1965), ou mesmo com a luz como fator essencial para a produção (SHILO, 1967).

O objetivo geral deste capítulo é avaliar a presença de interações químicas entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, e como elas podem ser influenciadas por alterações bióticas (densidade dos organismos) e abióticas (luz). Os objetivos específicos são: 1) testar o efeito da presença de um potencial competidor em diferentes densidades na atividade alelopática das duas espécies e 2) testar o efeito de diferentes intensidades luminosas nas interações entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Com base nos dados da literatura e no padrão de sucessão de espécies observado no Reservatório do Funil, a hipótese é que ambos os fatores podem afetar a produção de substâncias químicas, afetando diretamente os mecanismos de comunicação entre as espécies. Desta forma, maiores densidades da espécie produtora resultariam na inibição do crescimento da espécie alvo e que intensidades luminosas causadoras de estresse para cada espécie induziriam a produção de metabólitos secundários.

No presente estudo, como o interesse é a função ecológica das moléculas químicas excretadas, trataremos os metabólitos secundários excretados que influenciarem no desenvolvimento de outro componente biológico como aleloquímicos, e aqueles que influenciarem no desenvolvimento do próprio organismo produtor como compostos sinalizadores de *quorum sensing*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas

As cepas das cianobactérias CYRF (*Cylindrospermopsis raciborskii*) e MIRF (*Microcystis aeruginosa*) são provenientes do banco de cultura do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil). CYRF e MIRF foram isoladas do Reservatório do Funil (RJ) em 2005. As culturas foram mantidas no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora a aproximadamente 25°C, 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12 horas. Embora em condições ambientais *M. aeruginosa* possa ser encontrada tanto na forma colonial quanto na forma de células isoladas, a cepa MIRF se manteve completamente formada por células isoladas nas condições de crescimento em laboratório.

Experimentos

1. Competição como fator de estresse

Previamente ao experimento, monoculturas de CYRF, monoculturas de MIRF e culturas mistas de CYRF e MIRF em três proporções (1CYRF : 3MIRF, 1CYRF : 1MIRF e 3CYRF : 1MIRF) foram cultivadas. As duas espécies permaneceram em contato por quatro dias e as proporções foram avaliadas diariamente por meio de contagens em microscópio óptico (Olympus BX41) com o auxílio de câmara de Neubauer. As culturas mistas foram mantidas em meio de cultura Asm-1 e as monoculturas em meio WC modificado (LÜRLING e BEEKMAN, 1999). Todas as culturas foram mantidas a 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12 horas. Após os quatro dias de contato, as culturas foram filtradas em aparato de filtração estéril e filtro de fibra de vidro, poro 1,2 μm (Millipore, Irlanda). Assim, se obteve os filtrados livres de células contendo os exudatos provenientes das monoculturas e das culturas mistas de CYRF e MIRF. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 125

mL contendo 25 mL de meio de cultura e 25 mL do filtrado obtido. A estes tratamentos e ao controle foram adicionadas culturas de CYRF e MIRF a fim de se obter uma concentração inicial de $10^6 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”), com somente uma adição inicial de filtrado, de acordo com os seguintes tratamentos:

- Culturas de CYRF e MIRF expostas ao filtrado da monocultura de CYRF (1CYRF : 0MIRF);
- Culturas de CYRF e MIRF expostas ao filtrado da monocultura de MIRF (0CYRF : 1MIRF);
- Culturas de CYRF e MIRF expostas ao filtrado da cultura contendo 25% de CYRF e 75% de MIRF (1CYRF : 3MIRF);
- Culturas de CYRF e MIRF expostas ao filtrado da cultura contendo 50% de CYRF e 50% de MIRF (1CYRF : 1MIRF);
- Culturas de CYRF e MIRF expostas ao filtrado da cultura contendo 75% de CYRF e 25% de MIRF (3CYRF : 1MIRF).

Meio completo (25 mL de meio de cultura + 25 mL de meio de cultura filtrado) com as espécies alvo previamente inoculadas na mesma concentração dos tratamentos foi usado como controle. Nutrientes foram adicionados (macronutrientes e elementos traço) aos filtrados com o objetivo de corrigir o efeito causado pela limitação de nutrientes. Cada tratamento foi realizado em triplicata e mantido nas mesmas condições apresentadas acima (Fig. 1.1). Os Erlenmeyers foram mantidos a 25°C , $100 \mu\text{mol} \text{fótons} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12h.

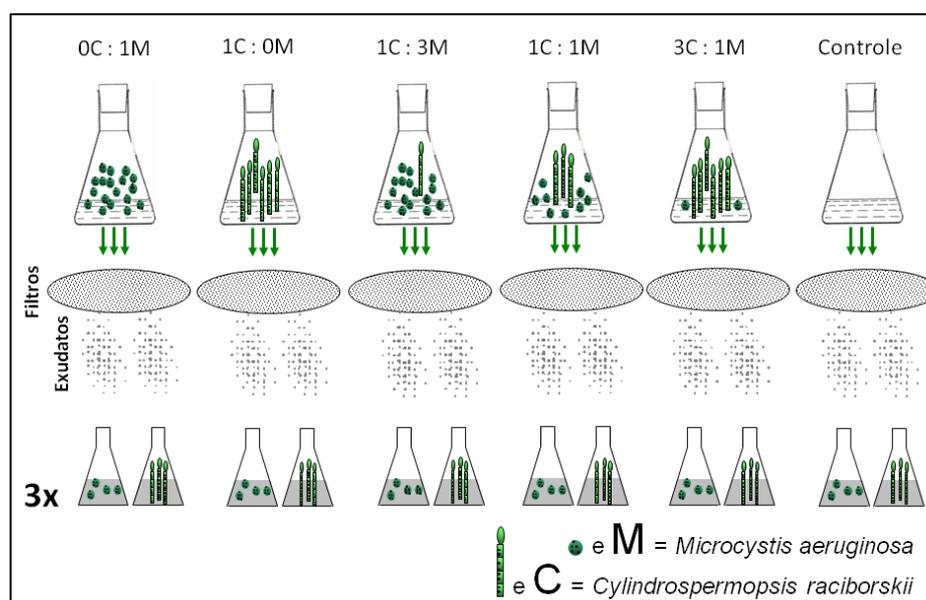


Figura 1.1. Desenho esquemático do experimento 1 (ver descrição acima).

2. Luz como fator de estresse

Previamente ao experimento, monoculturas de CYRF e de MIRF foram cultivadas a $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (luz sob o qual os experimentos dessa disserta\u00e7\u00e3o foram realizados), $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante um per\u00edodo de 10 dias. A intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ j\u00e1 foi utilizada como padr\u00e3o para a realiza\u00e7\u00e3o de experimentos em trabalho onde o efeito alelop\u00e1tico de organismos aqu\u00e1ticos foi testado (L\u00dcRLING et al., 2006). As culturas foram mantidas em meio Asm-1, exceto a cultura cultivada a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que foi mantida em meio WC. Todas as culturas foram mantidas a 25°C e fotoper\u00edodo de 12:12 horas. Ap\u00f3s os 10 dias, 150 mL de cada cultura foram filtrados em aparato de filtra\u00e7\u00e3o est\u00e9ril e filtro de fibra de vidro, poro $1,2 \mu\text{m}$ (Millipore, Irlanda). Assim, se obteve os filtrados livres de c\u00e9lulas contendo os exudatos provenientes de monoculturas de CYRF e MIRF sob diferentes condi\u00e7\u00f5es luminosas. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura e 25 mL do filtrado obtido. A estes tratamentos e controle foram adicionadas culturas de CYRF e MIRF (cultivadas a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a fim de se obter uma concentra\u00e7\u00e3o inicial de $10^7 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo "batch"), com somente uma adi\u00e7\u00e3o inicial de filtrado, e de acordo com os seguintes tratamentos:

- a) Filtrado de monocultura de *C. raciborskii* cultivada sob $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (CYRF 25) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- b) Filtrado de monocultura de *M. aeruginosa* cultivada sob $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (MIRF 25) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- c) Filtrado de monocultura de *C. raciborskii* cultivada sob $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (CYRF 100) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- d) Filtrado de monocultura de *M. aeruginosa* cultivada sob $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (MIRF 25) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- e) Filtrado de monocultura de *C. raciborski* cultivada sob $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (CYRF250) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- f) Filtrado de monocultura de *M. aeruginosa* cultivada sob $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (MIRF 250) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- g) Filtrado de monocultura de *C. raciborski* cultivada sob $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (CYRF 500) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF;
- h) Filtrado de monocultura de *C. raciborski* cultivada sob $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (CYRF 500) adicionado \u00e0 CYRF e MIRF.

Meio completo (25 mL de meio de cultura + 25 mL de meio de cultura filtrado), com as espécies alvo previamente inoculadas na mesma concentração dos tratamentos, foi usado como controle. Foram adicionados nutrientes (macronutrientes e elementos traço) aos filtrados, com o objetivo de corrigir o efeito da limitação por nutrientes. Para cada tratamento foram realizadas tréplicas (Fig. 1.2). Os frascos foram mantidos a 25°C, 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 12:12h.

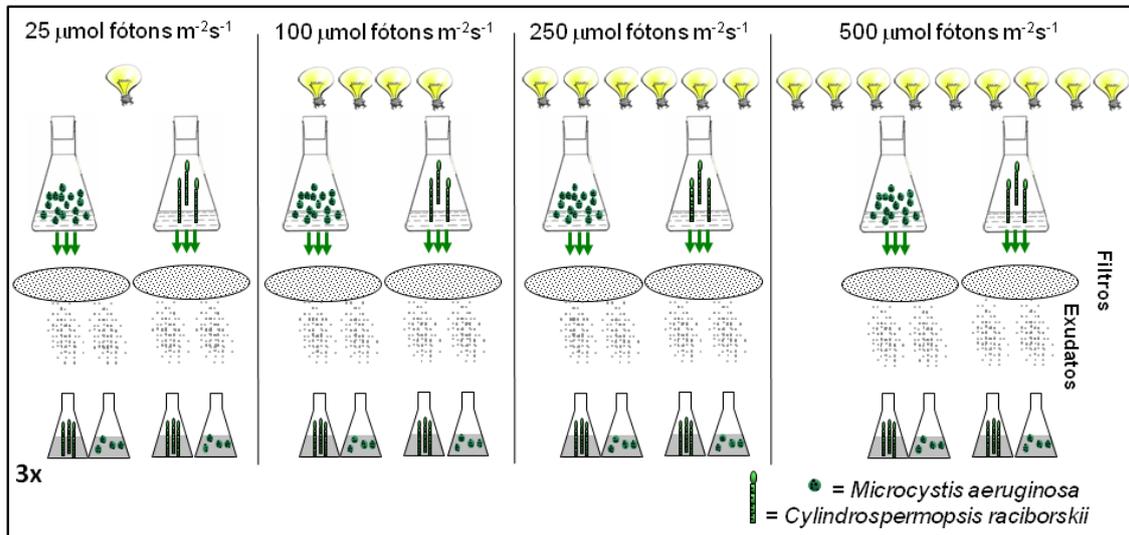


Figura 1.2 Desenho esquem\u00e1tico do experimento 2 (ver descri\u00e7\u00e3o acima).

An\u00e1lise dos dados

As esp\u00e9cies alvo ficaram em contato com os filtrados por 8 dias. Durante este per\u00edodo, amostras foram retiradas a cada dois dias e imediatamente fixadas com solu\u00e7\u00e3o de lugol ac\u00e9tico. A densidade celular foi estimada por meio de contagem em microsc\u00f3pio \u00f3ptico (Olympus BX41) com o aux\u00edlio de c\u00e2mara de Neubauer. A vari\u00e1vel escolhida para ser usada nas an\u00e1lises de crescimento celular foi o biovolume. Este foi estimado pela multiplica\u00e7\u00e3o da densidade de cada esp\u00e9cie pelo volume m\u00e9dio de suas c\u00e9lulas (HILLEBRAND et al., 1999).

As taxas de crescimento (μ) foram calculadas com base no aumento no biovolume durante a fase exponencial, de acordo com a equa\u00e7\u00e3o:

$$\mu = \{\ln(V_t) - \ln(V_0)\} \times \Delta t^{-1}$$

Sendo V_t = biovolume da cultura no tempo t ; V_0 = biovolume da cultura no tempo zero; Δt = per\u00edodo de tempo.

A ocorr\u00eancia de col\u00f4nias (definida como quando registrado um m\u00ednimo de tr\u00eas c\u00e9lulas agregadas) foi verificada por meio do total de c\u00e9lulas em col\u00f4nia durante a

avaliação da densidade. As taxas de crescimento, porcentagem de células em colônia e número de células por colônia foram estaticamente comparados por análise de variância one-way ANOVA seguido por teste de Tukey (quando $p < 0,05$) pelo software Jump5.0.1.

RESULTADOS

1. Competição como fator de estresse

Culturas de CYRF que receberam o exudato das monoculturas de CYRF e MIRF não apresentaram variação no crescimento quando comparadas com o controle (Fig. 1.3a). Da mesma forma, diferenças no crescimento de MIRF não foram observadas quando em contato com os filtrados as monoculturas de CYRF e MIRF (Fig. 1.3b).

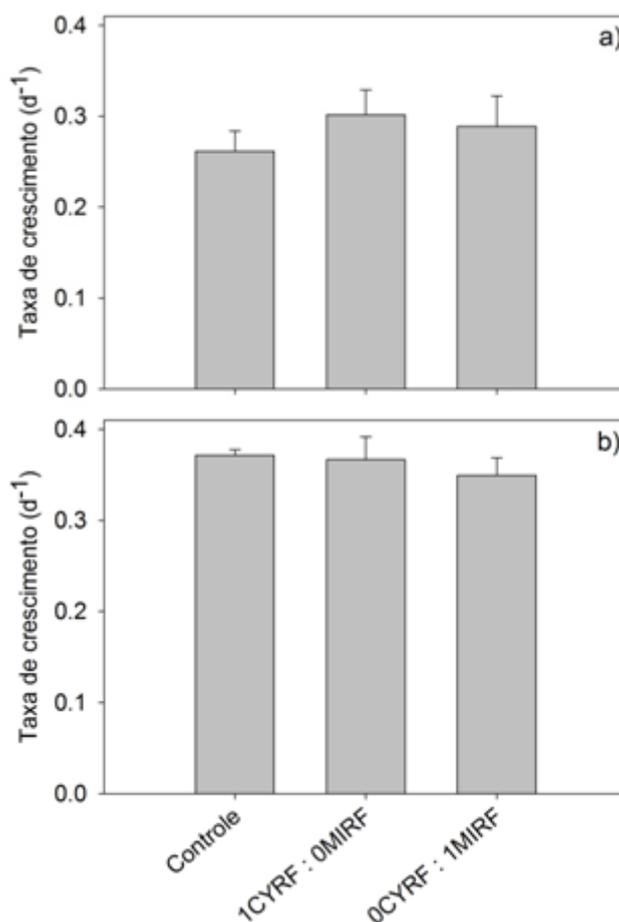


Figura 1.3. Taxas de crescimento de CYRF (a) e MIRF (b) quando expostas ao filtrados de monoculturas de CYRF (1CYRF : 0MIRF) e MIRF (0CYRF : 1MIRF).

Entretanto, o crescimento de CYRF foi significativamente inibido quando em contato com filtrados provenientes da cultura mista 3CYRF : 1MIRF ($F_{3,8} = 6,9$; $p = 0,013$). Apesar dos outros tratamentos não apresentarem diferenças significativas com relação ao controle, também observou-se um gradiente nos tratamentos onde houve inibição de CYRF, indiretamente relacionado com a quantidade de MIRF nas culturas mistas (Fig. 1.4).

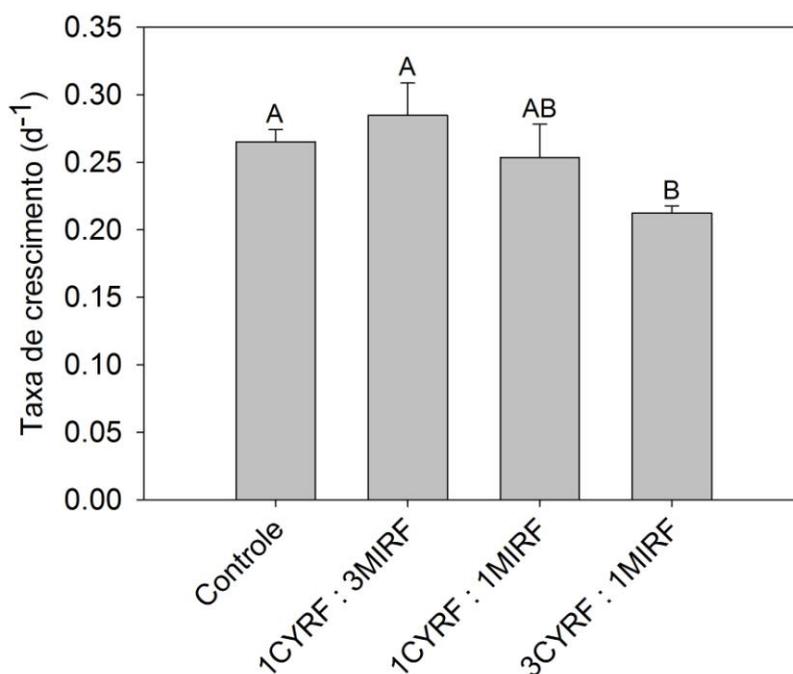


Figura 1.4. Taxas de crescimento de CYRF quando exposta ao filtrados das três culturas mistas. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$, em que letras diferentes representam diferença estatística.

Com relação à MIRF, seu crescimento foi inibido significativamente quando em contato com filtrados provenientes da cultura com 3CYRF : 1MIRF ($F_{3,8} = 17,1$; $p < 0,001$) (Fig. 1.5). Apesar dos outros tratamentos não apresentarem diferenças significativas com relação ao controle, a inibição de MIRF foi gradual e esteve diretamente relacionada com o aumento da proporção de CYRF nas culturas mistas (Fig. 1.6).

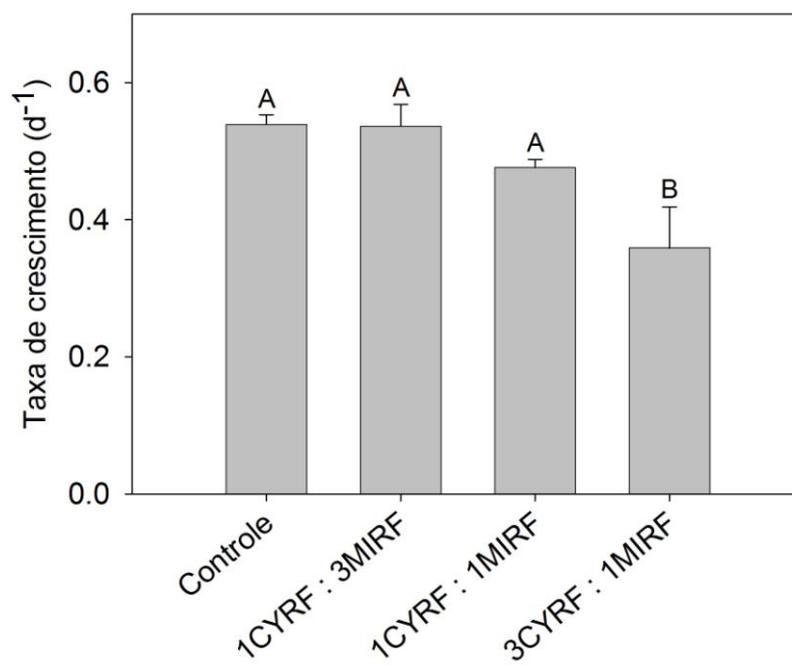


Figura 1.5. Taxas de crescimento de MIRF quando exposta ao filtrados das três culturas mistas. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística (quando $p < 0,05$), onde letras diferentes representam diferença estatística.

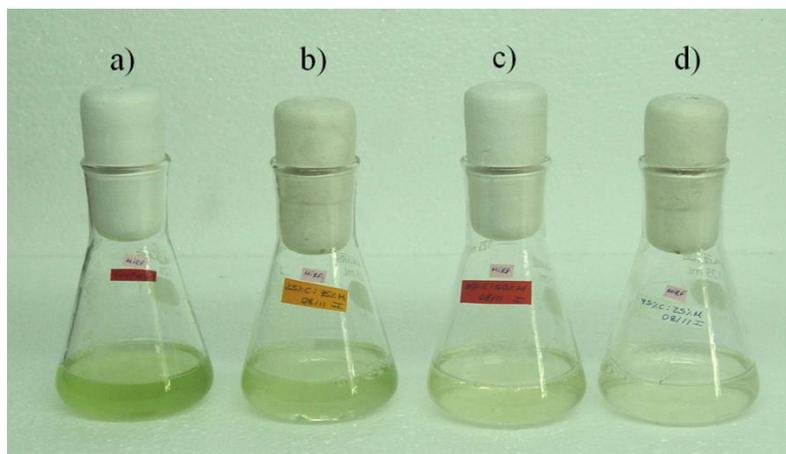


Figura 1.6. Aparência das culturas de MIRF ao final de doze dias: a) Controle; b) 1CYRF : 3MIRF; c) 1CYRF : 1MIRF; d) 3CYRF : 1MIRF. Cores mais claras representam menor crescimento e, consequentemente, maior inibição.

Além da inibição do crescimento, as culturas de MIRF expostas aos exudatos das três culturas mistas apresentaram-se em sua maioria sob forma de colônias ao final de oito dias. Ao contrário, as células do controle permaneceram isoladas ao longo de todo o experimento. Desta forma, ao final do experimento, os tratamentos que receberam filtrados das três culturas mistas apresentaram formação de colônias, diferente do controle, onde 100% das células permaneceram isoladas ($F_{3,8} = 2886,1$; $p < 0,001$). A porcentagem de células em colônias para os tratamentos que formaram colônias foi de 100% no tratamento 1CYRF : 3MIRF, 95% em 1CYRF : 1MIRF e 95,5% em 3CYRF : 1MIRF, formando um grupo homogêneo de acordo com o teste de Tukey (Fig. 1.7).

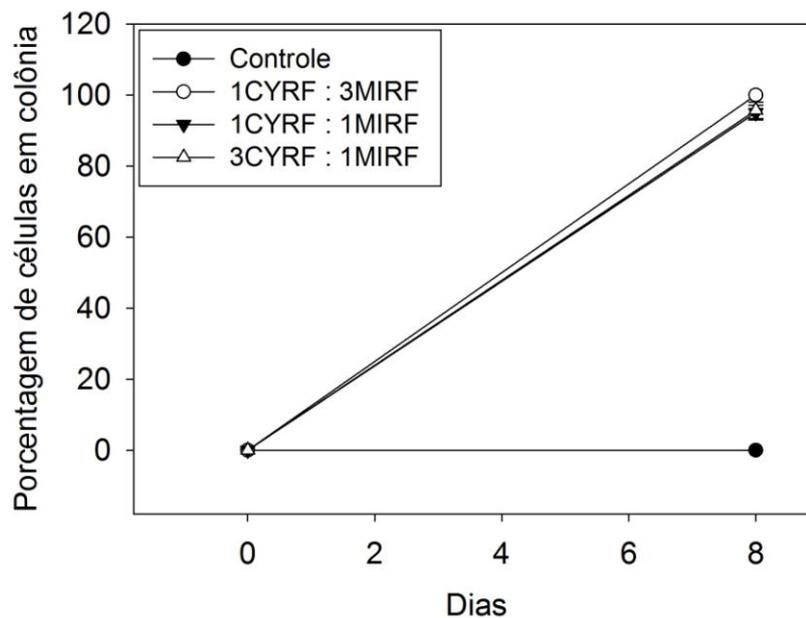


Figura 1.7. Porcentagem do número de células de MIRF em colônias ao final do experimento.

Analisando somente os tratamentos que formaram colônias, pôde-se observar diferenças entre os tamanhos das colônias ($F_{2,28} = 5,4$; $p = 0,010$). O teste de Tukey identificou dois grupos: 1) 1CYRF : 3MIRF e 1CYRF : 1MIRF, os quais apresentaram colônias com tamanho médio de 34 e 40 células, respectivamente e 2) 3CYRF : 1MIRF, que apresentou colônias com um tamanho médio de 20 células por colônia (Fig. 1.8).

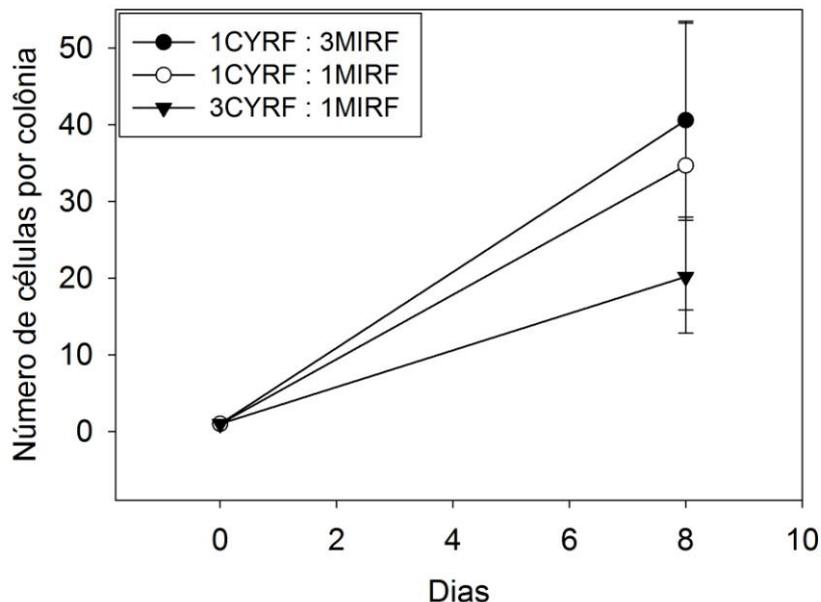


Figura 1.8. Tamanho das colônias de MIRF ao final do experimento.

2. Luz como fator de estresse

Os exudatos da cultura de CYRF cultivada à $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e à $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ não foram capazes de influenciar seu próprio crescimento e nem mesmo o crescimento de MIRF (Figs. 1.9a e 1.9b). No entanto, os exudatos da cultura de CYRF cultivada à luz $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inibiram seu próprio crescimento ($F_{1,4} = 13,6$; $p = 0,021$ e $F_{1,4} = 9,1$; $p = 0,037$ para 250 e $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente) mas não influenciaram o crescimento de MIRF (Figs. 1.9c e 1.9d). As taxas de crescimento de CYRF inibidas pelos exudatos das culturas a $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e a $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram estatisticamente iguais quando comparadas entre si.

O exudato de MIRF cultivada à $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inibiu o crescimento de CYRF ($F_{1,4} = 18,1$; $p = 0,013$), porém não influenciou seu próprio crescimento (Fig. 1.10a). Entretanto, o exudato de MIRF cultivada à $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ não inibiu o crescimento de CYRF e também não influenciou seu próprio crescimento (Fig. 1.10b). O exudato de MIRF cultivada à $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentou os mesmos resultados daquela cultivada à $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$: inibição do crescimento de CYRF ($F_{1,4} = 15,5$; $p = 0,017$) e não-influência no seu próprio crescimento (Fig. 1.10c). Já o exudato de MIRF cultivada à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ não foi capaz de influenciar o crescimento de CYRF e nem mesmo seu próprio crescimento (Fig. 1.10d).

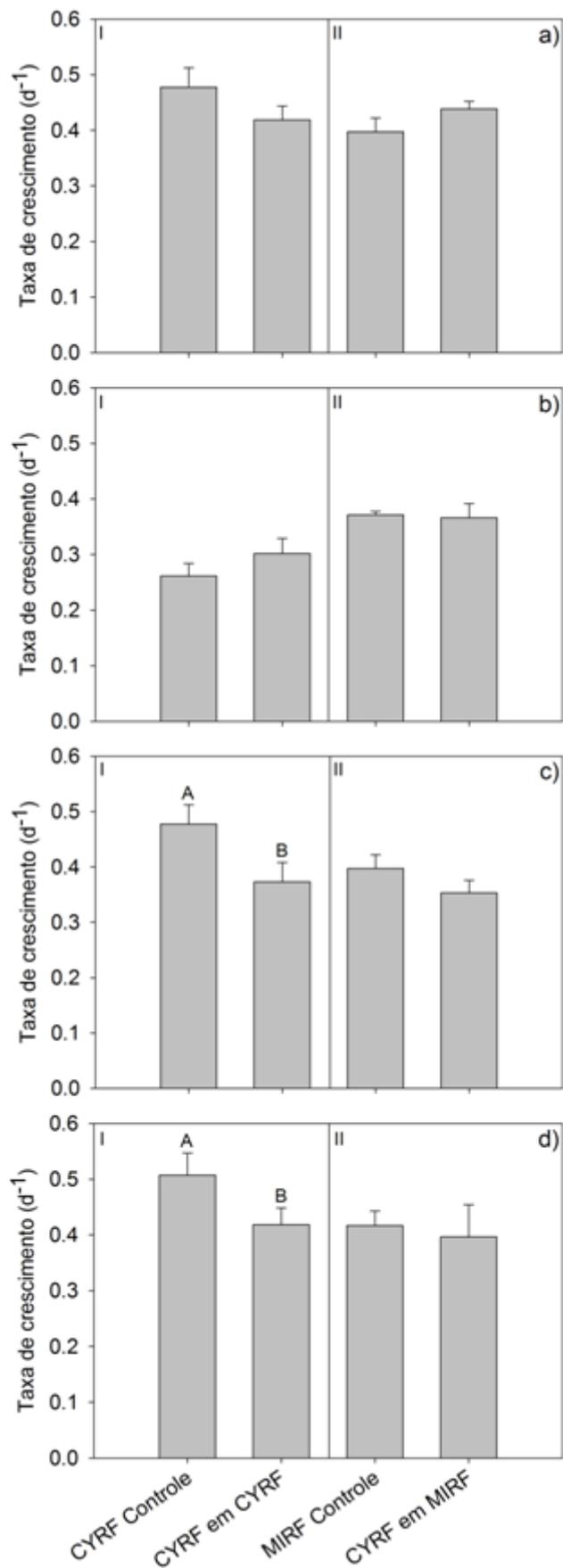


Figura 1.9. Taxas de crescimento de CYRF (I) e MIRF (II) quando expostas a: a) exudatos de CYRF cultivada à 25 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; b) exudatos de CYRF cultivada à 100 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; c) exudatos de CYRF cultivada à 250 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; d) exudatos de CYRF cultivada à 500 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$, em que letras diferentes representam diferença estatística. As comparações estatísticas foram feitas entre os tratamentos controles e suas respectivas cepas.

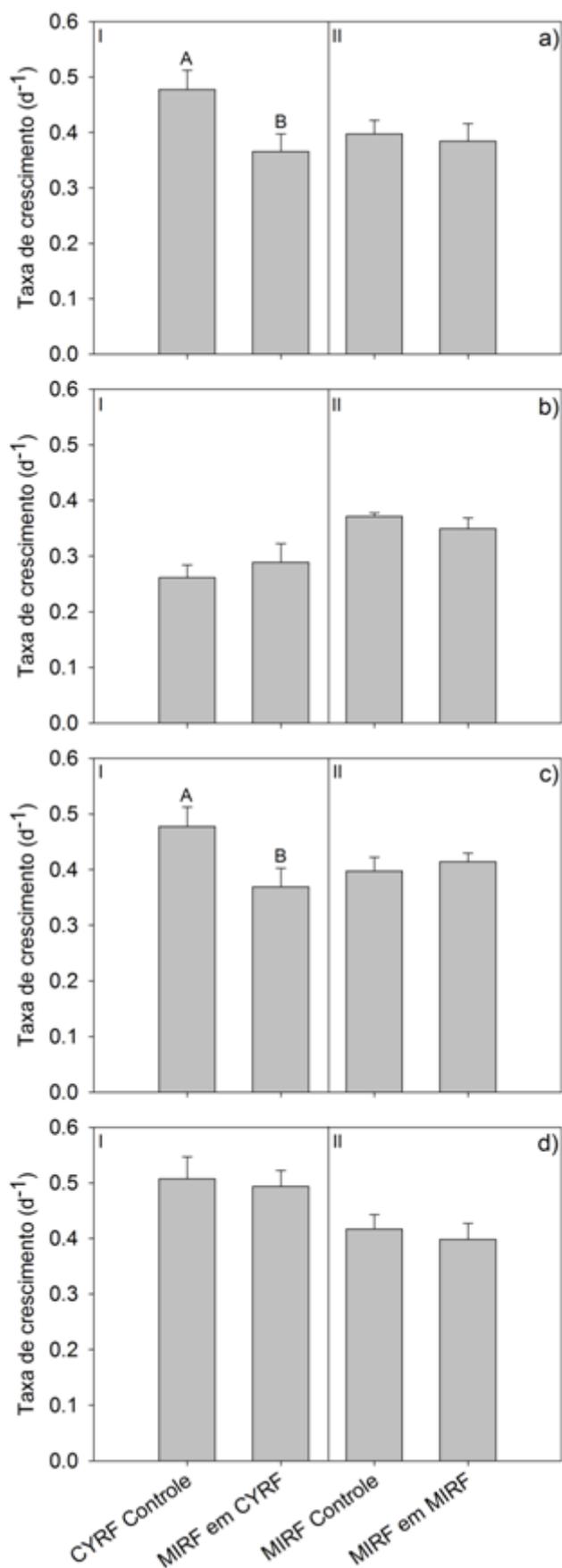


Figura 1.10. Taxas de crescimento de CYRF (I) e MIRF (II) quando expostas a: a) exudatos de MIRF cultivada à 25 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; b) exudatos de MIRF cultivada à 100 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; c) exudatos de MIRF cultivada à 250 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$; d) exudatos de MIRF cultivada à 500 μmol fótons $m^{-2}s^{-1}$. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$, em que letras diferentes representam diferença estatística. As comparações estatísticas foram feitas entre os tratamentos controles e suas respectivas cepas.

Além disso, pôde-se observar formação de colônias em MIRF expostas aos exudatos de culturas cultivadas à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($F_{2,6} = 117,8$; $p < 0,001$). Embora a formação de colônias também tenha sido observada quando MIRF recebeu exudato de CYRF cultivada à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, esta não foi significativa (Fig. 1.11). Ao final do experimento, MIRF que recebeu exudato de MIRF à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentou mais de 35% das células em colônias, enquanto que MIRF que recebeu o exudato de CYRF à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentou 2,5% de células em colônia e o controle permaneceu como células isoladas.

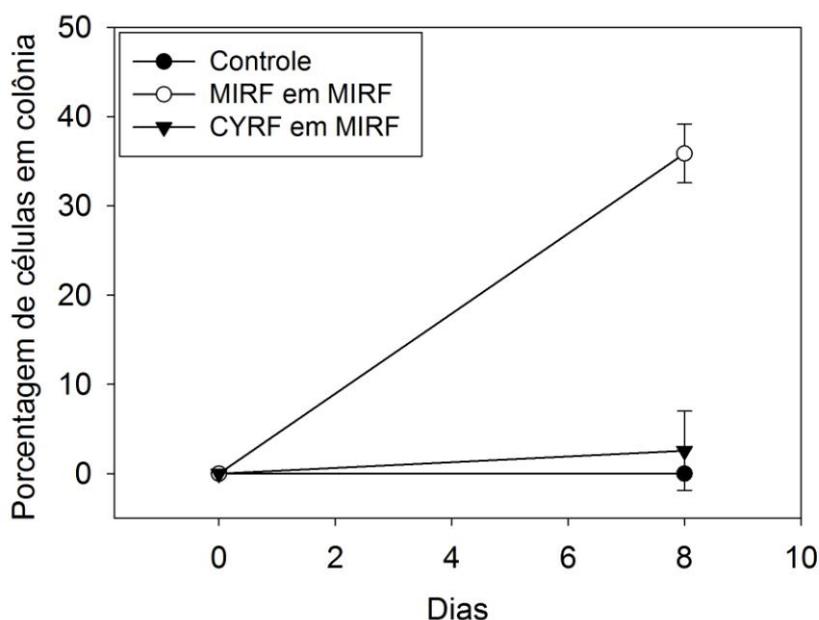


Figura 1.11. Porcentagem do número de células de MIRF em colônias quando expostas aos exudatos de MIRF e CYRF cultivadas à $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

DISCUSSÃO

1: Competição como fator de estresse

Os resultados observados apontam para a existência de interações químicas entre as duas cepas isoladas do Reservatório do Funil (CYRF e MIRF). Dentre essas interações, parece haver dois mecanismos ocorrendo concomitantemente: alelopatia e *quorum sensing*. Sugere-se que a inibição de CYRF e de MIRF tenha sido resultado de processos alelopáticos, em que possíveis aleloquímicos produzidos por MIRF inibiram CYRF, e possíveis aleloquímicos produzidos por CYRF inibiram MIRF. Entretanto, a formação de colônias em MIRF e a auto-inibição de CYRF parecem ser resultados de mecanismos de *quorum sensing*, em que no primeiro caso, sinais para

formação de colônias liberados por MIRF induziram a formação de colônias de MIRF, enquanto que moléculas auto-inibidoras produzidas por CYRF parecem ter inibido seu próprio crescimento (ver Fig. 1.12).

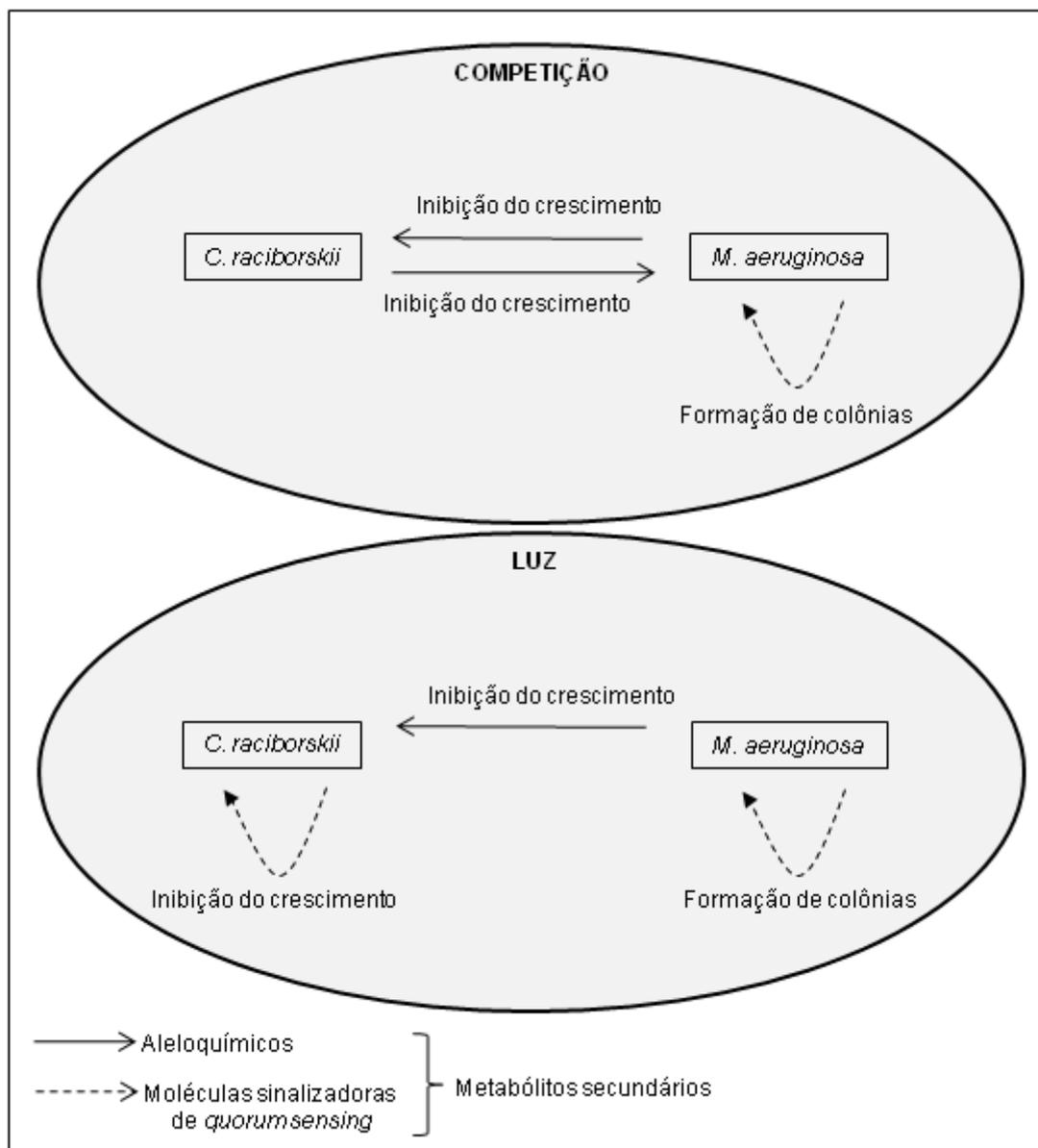


Figura 1.12. Resumo esquemático dos resultados encontrados nos experimentos 1 e 2.

Os resultados positivos encontrados apenas nos tratamentos em que CYRF e MIRF foram expostas a exudatos de culturas mistas apontam a competição como um fator de estresse capaz de induzir a produção de aleloquímicos e de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*. Em bactérias, o *quorum sensing* é definido como um mecanismo de comunicação microbiana densidade-dependente (KELLER e SURETTE, 2006; STRAIGHT e KOLTER, 2009). Da mesma forma, efeitos alelopáticos também vêm sendo apontados como densidade-dependente (SCHMIDT e HANSEN, 2001; GRANÉLI et al., 2008). Assim, espera-se que quanto maior o tamanho da

população produtora de moléculas para comunicação química, maior será a força da resposta da população alvo a essas moléculas (GRANÉLI e SALOMON, 2010). A inibição de MIRF somente pelo exudato da cultura com maior quantidade de CYRF (3CYRF : 1MIRF) aponta para o efeito de aleloquímicos provenientes de CYRF. Nesta cultura mista, a quantidade de metabólitos secundários excretados por CYRF tende a ser maior do que os excretados por MIRF devido à maior densidade de CYRF. Além disso, essa inibição parece ter ocorrido sob dose dependência, ou seja, diretamente de acordo com a quantidade gradativa de CYRF na cultura mista (ver Fig. 1.7). Exudatos provenientes de *C. raciborskii* já foram relatados como capazes de causar fortes efeitos inibitórios na atividade fotossintética de *M. aeruginosa* (FIGUEREDO *et al.*, 2007). Assim, juntamente com outros aspectos da ecologia de *C. raciborskii* (PADISÁK, 1997; BRIAND *et al.*, 2004), a produção de aleloquímicos inibidores do crescimento de outras algas pode ser também um fator importante relacionado com a alta capacidade dispersiva e invasiva dessa espécie (FIGUEREDO *et al.*, 2007).

A completa formação de colônias em MIRF, apresentando 100% das células sob forma de colônias no tratamento 1CYRF : 3MIRF, indica que o sinal para formação de colônia tende a ser proveniente de MIRF, devido à sua maior densidade nesta cultura mista. Apesar dos tratamentos que receberam filtrados das culturas mistas não apresentarem diferenças significativas na proporção de células em colônias, uma diferenciação pôde ser evidente com relação ao tamanho das colônias. As colônias do tratamento com menor proporção de MIRF (3CYRF : 1MIRF) foram duas vezes menores do que as colônias dos outros tratamentos. Esse dado reforça a hipótese de que sendo a população na cultura mista menor, menor será a quantidade de metabólitos secundários excretados e, conseqüentemente, menor será a força da resposta da população alvo. Mecanismos de defesa e de tolerância podem ser esperados quando o organismo alvo co-existe com o organismo produtor (LEFLAIVE *et al.*, 2008). Desta forma, a formação de colônias em MIRF parece ser um mecanismo de defesa engatilhado por uma situação de estresse (como a presença de um potencial competidor), sendo uma possível resposta aos aleloquímicos de CYRF. A formação de colônias como um mecanismo de defesa também já foi sugerida por PARK *et al.* (2009). Neste trabalho foi mostrado que quando *M. aeruginosa* foi exposta ao composto alelopático proveniente do extrato bruto de *Oryza sativa* (arroz), células isoladas tiveram seu crescimento mais fortemente inibido do que quando em colônias.

A capacidade de se comunicar por *quorum sensing* já foi sugerida para o gênero *Microcystis*, em que foi proposta a produção de um sinal, ainda desconhecido, capaz

de interferir em sua própria divisão celular, resultando em inibição do crescimento e tendência à agregação celular (SANTOS, 2009). Esses resultados corroboram a hipótese de que a formação de colônias em *M. aeruginosa* é um processo induzido por moléculas de *quorum sensing*. A presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* foi descrita pela primeira vez para o gênero de cianobactéria *Gloeothoece* (SHARIF et al., 2008). Nesse trabalho, a molécula sinalizadora de *quorum sensing* mais extensivamente estudada e reportada para o grupo das bactérias Gram-negativas (N-acil-homoserina lactonas) foi detectada em culturas axênicas de *Gloeothoece*.

Quando CYRF recebeu os exudatos das culturas mistas, inibição significativa também foi observada somente no tratamento 3CYRF : 1MIRF. Baseado no conceito de *quorum sensing* em que diz que maiores efeitos estão relacionados com maiores densidades do organismo produtor de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*, a inibição de CYRF pelo exudato da cultura com maior quantidade de CYRF parece ter sido causada por processos de *quorum sensing* e não alelopatia. CYRF estaria sendo inibida quando em contato com compostos auto-inibidores produzidos por ela mesma do que por possíveis compostos inibidores (alelopáticos) produzidos por MIRF. A produção de compostos auto-inibidores por parte de CYRF estaria relacionada com o estresse representado pela presença de um potencial competidor (MIRF). LAZZERA (2000) mostrou que em uma população da bactéria *Bacillus subtilis* a produção de moléculas de *quorum sensing* foi engatilhada por mudanças nas condições nutricionais. No caso, o decréscimo de nutriente foi um agente estressante que levou à produção de moléculas de *quorum sensing* com a finalidade de induzir a entrada da população na fase estacionária de crescimento. A informação passada pelas moléculas de *quorum sensing* para entrada da população na fase estacionária significa cessar o crescimento populacional (FOGG e THAKE, 1987). O resultado de cessar o crescimento populacional precocemente devido ao contato com moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* é expresso na inibição do crescimento populacional quando comparado com a população que não entrou em contato com essas moléculas. O decréscimo de nutrientes como agente estressante e engatilhador do aumento da produção de metabólitos secundários também foi relatado nos trabalhos de VON ELERT e JUTTNER (1997) e GRANÉLI E JOHANSSON (2003). Neste último, três microalgas tiveram seu crescimento significativamente inibido quando expostas a aleloquímicos de *Prymnesium parvum* cultivado em meio com limitação de nutrientes do que quando expostas a aleloquímicos de *P. parvum* cultivado sem depleção de nutrientes. Desta forma, esses dados estão de acordo com os encontrados em nosso

trabalho, em que o agente estressante capaz de induzir a produção de metabólitos secundários, no caso, moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*, foi representado pela presença de um potencial competidor. Entretanto, ecologicamente, a auto-inibição do crescimento frente ao estresse de um potencial competidor parece não ser uma vantagem competitiva, diferente do que acontece frente à depleção de nutrientes. Desta forma, a inibição de CYRF pelo exudato da cultura 3CYRF : 1MIRF não parece ser resultado de *quorum sensing* e sim ser devido à ação de aleloquímicos provenientes de MIRF. Por estar em menor densidade, e por isso sob maior estresse do que quando em maior densidade, MIRF estaria produzindo aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de CYRF afim de reverter a proporção de densidade na cultura com 3 : 1. A capacidade de produzir substâncias inibidoras do crescimento de um potencial competidor já foi reportada para *M. aeruginosa*, sendo essa uma vantagem competitiva da espécie (SINGH et al., 2001) Entretanto, os resultados encontrados em nosso trabalho não estão de acordo com a dependência da densidade que vêm sendo descrita para trabalhos sobre interações químicas (STRAIGHT e KOLTER, 2009; SCHMIDT e HANSEN, 2001; GRANÉLI et al., 2008).

2. Luz como fator de estresse

Os resultados encontrados indicam que a luz, assim como a competição, pode ser um fator de estresse capaz de promover a produção de metabólitos capazes de influenciar no desenvolvimento de um potencial competidor. Nestes experimentos também foram observados efeitos decorrentes de processos alelopáticos e de comunicação por *quorum sensing* (ver Fig. 1.12). Diferente da competição, nenhuma intensidade luminosa testada foi capaz de induzir em CYRF a produção de aleloquímicos capazes de inibir MIRF. Na literatura, diversas intensidades luminosas vem sendo utilizadas. LEFLAIVE e TEN-HAGE (2009) consideraram $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como luz alta e $4 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como luz baixa, enquanto CARNEIRO et al. (2009) usaram $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como intensidade luminosa mais alta e $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como intensidade luminosa mais baixa. No Reservatório do Funil, local de origem da cepa CYRF, a disponibilidade de luz no período de dominância de *C. raciborskii* foi em torno de $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. No período em que *M. aeruginosa* forma floração, $2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram registrados. Nesse período, *C. raciborskii* foi encontrada somente à 4m de profundidade na coluna d'água, onde a disponibilidade de luz esteve em torno de $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (SOARES et al., 2009). Diante disso, as intensidades luminosas usadas em nosso experimento foram

selecionadas de acordo com os valores observados em campo. Além disto, dados da literatura sobre a influência da luz na produção de metabólitos secundários por cianobactérias são ainda contraditórios (GRANÉLI e SALOMON, 2010) e um padrão ainda não foi estabelecido. *Cylindrospermopsis raciborskii* apresentou variação na produção de toxina de acordo com a luz, em que a maior concentração de toxina (intra e extracelular) foi registrada a $140 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, intensidade considerada alta pelos autores (DYBLE et al., 2006). De forma semelhante, CARNEIRO et al. (2009) encontraram maiores concentrações de saxitoxinas e neosaxitoxinas em células cultivadas a $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. No entanto, toxinas e compostos alelopáticos podem ter funções e rotas metabólicas diferentes, reguladas por fatores diferentes (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007).

No presente trabalho, as intensidades luminosas de $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ parecem promover em CYRF a produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*, induzindo CYRF a produzir moléculas auto-inibidoras do crescimento. A ação de metabólitos secundários produzidos pela própria CYRF pôde ser percebida já que as prováveis moléculas de *quorum sensing* responsáveis pela auto-inibição foram provenientes de uma monocultura de CYRF. *Cylindrospermopsis raciborskii* vem sendo considerada uma espécie com baixo requerimento por luz (PADISÁK, 1997; BOUVY et al., 2000). BRIAND et al. (2004) reportaram máximas taxas de crescimento para seis linhagens da espécie em torno de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto MIRANDA (2009) apontou menores taxas de crescimento para *C. raciborskii* cultivada a 250 do que a $25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O'BRIEN et al. (2009) descreveram *C. raciborskii* como mais sensível à fotoinibição do que outras cianobactérias, sendo fotoinibida a um limiar de 500-600 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Assim, a indução da inibição de seu próprio crescimento quando estressada por muita luz parece estar de acordo com os parâmetros ecológicos que vêm sendo descritos para a espécie.

Casos de comunicação por *quorum sensing* ainda não foram relatados para o gênero *Cylindrospermopsis*. Até o estudo de SHARIF et al. (2008), moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* não haviam sido especificamente detectadas para cianobactérias. Pouco se sabe sobre os processos de *quorum sensing* e seu papel ecológico em populações de cianobactérias. Para bactérias, entretanto, maior quantidade de dados sobre este mecanismo está disponível. A sinalização por meio de moléculas de *quorum sensing* em uma população de bactérias foi engatilhada por uma situação de estresse (LAZAZZERA, 2000), como foi discutido no experimento anterior.

De forma semelhante parece ocorrer a sinalização de CYRF por meio de moléculas de *quorum sensing* para cessar seu crescimento frente a um estresse por luz. O sinal de CYRF para cessar seu próprio crescimento quando em estresse por luz seria para prevenir o gasto metabólico em crescimento populacional, já que este seria afetado pela fotoinibição, ou mesmo um efeito secundário de excretas produzidas a essas intensidades luminosas que acabam por levar à auto-inibição como resultado de um efeito secundário.

A produção de moléculas de *quorum sensing* auto-inibidoras do crescimento de CYRF parece não ter acompanhado o aumento da intensidade luminosa de 250 para 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A inibição do crescimento de CYRF que recebeu exudato da cultura a 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi a mesma que de CYRF que recebeu exudato da cultura a 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O efeito na produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em CYRF parece, desta forma, ser o mesmo em intensidades luminosas acima de 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, apontando para a saturação desse processo. Outros importantes processos metabólicos em cianobactérias, como a fotossíntese, podem ser saturados a partir de um limiar de intensidade luminosa. Densas natas de cianobactérias expostas a intensidades luminosas de 0 a 1560 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tiveram a taxa fotossintética aumentada de acordo com a intensidade luminosa e saturaram a intensidades maiores do que 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (WIELAND e KUHL, 2006). Para um maior conhecimento dos limites de intensidade luminosa de saturação para a produção de metabólitos secundários por CYRF, intervalos menores de intensidades luminosas entre 25 e 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e intensidades maiores do que 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ devem ser testados.

Diferente dos resultados utilizando competição como fator de estresse, o efeito da parece influenciar na produção de aleloquímicos em MIRF. Enquanto a intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para CYRF não produziu nenhum tipo de reação sobre ela mesma ou sobre MIRF, para MIRF essa intensidade luminosa induziu a produção de aleloquímicos. Devido ao baixo requerimento de *C. raciborskii* por luz (PADISÁK, 1997), o crescimento a 25 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para CYRF parece não ter sido uma situação de estresse. Entretanto, taxas de crescimento de *M. aeruginosa* foram menores a baixas intensidades luminosas (40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (RAPS et al., 1983) e essa vem sendo descrita como tendo maior sucesso a altas intensidades luminosas (SOARES et al., 2009). Experimentos em laboratório mostraram que MIRF apresentou menores taxas de crescimento quando cultivada a 25 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ do que a 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (MIRANDA, 2009). Desta forma, a intensidade luminosa

de 25 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ parece figurar uma situação de estresse para MIRF, engatilhando a produção de metabólitos secundários inibidores do crescimento de CYRF.

Os resultados observados quando MIRF foi cultivada à luz baixa foram diferentes daqueles observados quando MIRF foi cultivada à luz padrão, quando nenhum tipo de efeito foi observado. Quando cultivada à luz intermediária, no entanto, os resultados observados foram similares aos encontrados em luz baixa, havendo novamente inibição de CYRF. A possível produção de aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de CYRF pode ser uma característica da cepa quando cultivada a luz baixa e intermediária. WIEDNER et al. (2003) mostraram que *M. aeruginosa* produziu maior quantidade de toxinas, que também são descritas como metabólitos secundários, em intensidades luminosas mais altas. Nesse trabalho, porém, a variação de intensidade luminosa que influenciou na produção de toxina foi de 10 a 40 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Percebe-se, novamente, que na literatura as intensidades luminosas testadas apresentam grande variação, dificultando assim a determinação de padrões relacionados à variável luz. Quando cultivada à luz alta, exudatos de MIRF não foram capazes de inibir CYRF, porém induziram a formação de colônias em MIRF. GRANÉLI e SALOMON (2010) relataram a diminuição da toxicidade em intensidades luminosas acima de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para a microalga *Prymnesium parvum*. Levando em consideração a grande variação de resultados encontrados em diferentes intensidades luminosas relatados na literatura, os resultados de GRANÉLI e SALOMON estão de acordo com os apresentados neste trabalho. Em que altas intensidades luminosas podem levar à diminuição da produção de metabólitos secundários causada pela elevada fotodegradação dos compostos aleloquímicos ou pela diminuição da produção de metabólitos secundários devido ao aumento da atividade fotossintética das células sob luz alta (PARNAS et al., 1962).

Assim como foi relatado nos experimentos de competição, a luz alta como fator de estresse parece ter induzido a produção de moléculas de *quorum sensing* para formação de colônias em MIRF. Nossos resultados diferem dos encontrados por BECKER (2010), em que *M. aeruginosa* foi cultivada na presença de extrato de células de *M. aeruginosa* rompidas e maior tendência à agregação celular foi registrada quando cultivadas à baixa luz (40 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) do que à alta luz (120 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Entretanto, BECKER classificou como luz alta a intensidade luminosa de 120 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que se assemelha à classificada como intensidade luminosa padrão no presente trabalho. A intensidade luminosa alta utilizada no presente estudo

é quase cinco vezes maior do que a classificada como alta por BECKER. Essa diferença na metodologia parece explicar a diferença nos resultados encontrados. Além disso, a formação de colônias em *M. aeruginosa* já foi reportada como vantagem competitiva da espécie, em que colônias aumentaram o auto-sombreamento, reduzindo os danos causados por altas intensidades luminosas, e levando, conseqüentemente, a um maior sucesso ecológico da espécie em situações adversas (ROBARTS e ZOHARY, 1984). Nesse experimento, uma possível comunicação por *quorum sensing* pôde ser mais evidente já que moléculas produzidas apenas por MIRF entraram em contato com as células soltas de MIRF. Desta forma, podemos afirmar que a formação de colônia em MIRF pode ser um mecanismo engatilhado por comunicação intra-específica.

Diferente do efeito em CYRF, o estresse por luz não foi capaz de induzir em MIRF a produção de moléculas de *quorum sensing* que inibissem seu próprio crescimento. O mesmo foi encontrado em nosso experimento onde o fator estressante foi a competição. Diante disso, podemos dizer que, nestas situações, MIRF não tem a capacidade de inibir seu próprio crescimento.

CONCLUSÃO

A competição como fator de estresse parece induzir em CYRF a produção de aleloquímicos inibidores de MIRF, enquanto que o mesmo não foi observado quando a luz foi o fator de estresse. Porém, a luz como fator de estresse induziu em CYRF a produção de possíveis moléculas de *quorum sensing* capazes de auto-inibir seu crescimento. Por sua vez, tanto competição quanto luz como fatores de estresse parecem induzir em MIRF a produção de aleloquímicos inibidores de CYRF. Da mesma forma, tanto competição quanto luz como fatores de estresse parecem induzir em MIRF a produção de moléculas de *quorum sensing* para formação de colônias. Entretanto, competição e luz como fatores de estresse parecem não induzir em MIRF a produção de moléculas de *quorum sensing* auto-inibidoras do crescimento.

Esses resultados sugerem que ambas as cepas possuem capacidades alelopáticas, porém em diferentes condições. Sabe-se que organismos co-existentes têm a capacidade de co-evoluir e adaptarem-se um ao outro, principalmente quando interações químicas estão envolvidas. Assim, a co-evolução pôde também resultar em interações recíprocas onde ambos os micro-organismos envolvidos foram capazes de produzir aleloquímicos. Os resultados também apontaram que ambas as cepas

possuem a capacidade de se comunicar por *quorum sensing*, porém MIRF em nenhum caso foi capaz de inibir seu próprio crescimento. Frente às condições testadas, o estresse por competição parece ser deletério para ambas as espécies, enquanto que o estresse por luz parecer ser mais prejudicial ao crescimento de CYRF. Em situações naturais, altas intensidades luminosas poderão favorecer maiores densidades de *M. aeruginosa*. Cabe ressaltar, no entanto, que em ambientes naturais os fatores competição e luz, juntamente com outros fatores abióticos e bióticos, podem atuar em sinergia.

Devido a essa sinergia, a identificação de interações químicas como fator promotor de florações de cianobactérias no ambiente é dificultada. Entretanto, quando certa espécie inicia uma floração devido a fatores em que os mecanismos de ação são melhores conhecidos, como por exemplo, o padrão de mistura e a disponibilidade de nutrientes, interações químicas podem ser responsáveis pela manutenção e dominância monoespecífica dessa floração, causando decréscimo da diversidade planctônica durante as florações. Este trabalho aponta que, além dos parâmetros convencionais capazes de explicar as florações de cianobactérias, a presença de interações químicas e seus mecanismos de atuação devem ser levadas em consideração ao se buscar uma melhor compreensão dos mecanismos ecológicos envolvidos nesses eventos.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

COMPETIÇÃO ENTRE CIANOBACTÉRIAS COMO FATOR INDUTOR DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

ASPECTOS TEÓRICOS, OBJETIVOS E HIPÓTESES

A formação de colônias em *Microcystis aeruginosa* induzida por sinais químicos provenientes de predadores tem sido apontada como um mecanismo de defesa contra a herbivoria (HA et al., 2004; YANG et al., 2005; YANG et al., 2009; BECKER, 2010). Além disso, também foi reportada a formação de colônias da microalga *Scenedesmus obliquus* induzida por aleloquímicos excretados pela macrófita *Stratiotes aloides* (MULDERIJ et al., 2005). De forma semelhante, a formação de colônias de *Desmodesmus quadricolor*, uma microalga com disposição morfológica semelhante à *S.obliquus*, foi induzida por aleloquímicos excretados pela alga filamentosa *Uronema confervicolum* (LEFLAIVE et al., 2008). Em ambos os trabalhos, a formação de colônias foi relacionada ao fato de que colônias possuem maior taxa de sedimentação quando comparadas com células isoladas da mesma espécie. Assim, quando em colônias, as microalgas sedimentariam mais rapidamente do que quando em células isoladas, deixando as camadas superficiais da coluna d'água e, conseqüentemente, reduzindo a competição por luz entre as microalgas e os organismos produtores de aleloquímicos (no caso, macrófita e microalga).

A formação de colônias de *D. quadricolor* em resposta a compostos aleloquímicos provenientes da alga filamentosa *U. confervicolum* foi explicada pelos autores como resultado da co-evolução entre os micro-organismos (LEFLAIVE et al., 2008). Quando metabólitos secundários de *M. aeruginosa* foram adicionados em comunidades de bactérias co-existent e não co-existent com *M. aeruginosa*, maior resistência foi encontrada nas comunidades co-existent (CASAMATTA e WICKSTROM, 2000). Desta maneira, nas interações químicas, a co-evolução das espécies parece representar um aspecto importante.

Como observado no Capítulo 1, a formação de colônias em MIRF (cepa de *M. aeruginosa* isolada do Reservatório do Funil) foi estimulada por exudatos provenientes da competição entre CYRF (cepa de *C. raciborskii* isolada do Reservatório do Funil) e MIRF. Além disto, MELLO et al. (*em prep.*) mostraram que outras duas cepas de *M. aeruginosa* provenientes de diferentes locais de origem não foram capazes de

responder com formação de colônia ao exudato proveniente da competição entre CYRF e MIRF. Assim, o objetivo geral deste capítulo foi verificar como a competição entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* induz a formação de colônias em *M. aeruginosa*. Os objetivos específicos foram: 1) testar os efeitos da competição de MIRF e outras cepas de *C. raciborskii* na formação de colônias de MIRF e 2) testar os efeitos da competição de CYRF e MIRF em diferentes cepas de *M. aeruginosa*. A hipótese é de que tal mecanismo é relacionado a processos de co-evolução e as respostas seriam mais evidentes em cepas previamente relacionadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas

As culturas utilizadas nos experimentos 1 e 2 estão descritas na Tabelas 1 e 2, respectivamente. As culturas foram mantidas no Laboratório de Plâncton da Universidade de Wageningen (Holanda) a 27°C, 35 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14:10 horas (claro:escuro) e meio de cultura WC (LÜRLING e BEEKMAN, 1999). Embora *M. aeruginosa* possa ser encontrada tanto na forma colonial quanto em células isoladas em condições ambientais, as cepas utilizadas estiveram completamente formadas por células isoladas nas condições de crescimento em laboratório.

Tabela 1. Cepas utilizadas no experimento 1.

Espécie	Nome da Cepa	Origem	Cianotoxinas
<i>M. aeruginosa</i>	MIRF	Reservatório do Funil – RJ – Brasil	Microcistinas ¹
<i>C. raciborskii</i>	T3	SP – Brasil	Saxitoxina e neosaxitoxinas ²
<i>C. raciborskii</i>	PMC99.06	Espazone – México	Não produz ³
<i>C. raciborskii</i>	G75	Alemanha	Não identificada ou desconhecida ⁴
<i>C. raciborskii</i>	PMC124.02	França	Não informado
<i>C. raciborskii</i>	Austr.	Austrália	Cilindrospermopsina ⁵
<i>C. raciborskii</i>	CS-1	PE – Brasil	Não produz ⁶
<i>C. raciborskii</i>	CYRF	Reservatório do Funil – RJ – Brasil	Saxitoxinas e goniautoxinas ¹

¹ FERRÃO-FILHO et al., 2008; ² POMATI et al., 2003; ³ BERNARD et al., 2003; ⁴ FASTNER et al., 2003; ⁵ CSIRO Collection of Living Micro-algae, CSIRO Marine and Atmospheric Research; ⁶ Comunicação pessoal, Marinho, M. M., UERJ.

Tabela 2. Cepas utilizadas no experimento 2.

Espécie	Nome da cepa	Origem	Cianotoxinas
<i>C. raciborskii</i>	CYRF	Reservatório do Funil – RJ – Brasil	Saxitoxinas e goniautoxinas ¹
<i>M. aeruginosa</i>	MIRF	Reservatório do Funil – RJ – Brasil	Microcistinas ¹
<i>M. aeruginosa</i>	CYA43	Estados Unidos	Não produz ²
<i>M. aeruginosa</i>	NPJB-1	SP – Brasil	Microcistinas ³
<i>M. aeruginosa</i>	LEA-04	GO – Brasil	Microcistinas ⁴
<i>M. aeruginosa</i>	PCC7806*	Holanda	Não produz microcistina ⁵
<i>M. aeruginosa</i>	CYA140	Canadá	Microcistinas ²
<i>M. aeruginosa</i>	PCC7820	Escócia	Microcistinas ⁶
<i>M. aeruginosa</i>	NPLJ-4	RJ – Brasil	Microcistinas ⁷
<i>M. aeruginosa</i>	V131	Holanda	Não produz ⁸
<i>M. aeruginosa</i>	PCC7005	Estados Unidos	Não produz ⁹

* = variação mutante não-produtora de microcistina da cepa PCC7806.

¹FERRAO-FILHO et al., 2008; ²PIRES et al., 2003; ³AZEVEDO et al., 1994; ⁴ Comunicação pessoal, Marinho, M. M., UERJ; ⁵ DITTMANN et al., 1997; ⁶ ROBILLOT et al., 2000; ⁷ SOARES et al., 2004; ⁸ PIREs et al., 2005; ⁹ SEDMAK et al., 2008.

Experimentos

1: Efeito de diferentes cepas de *C. raciborskii* na formação de colônias em MIRF

Previamente ao experimento, sete diferentes cepas de *C. raciborskii* (Tab. 1) foram cultivadas em monoculturas (1 : 0). Além disso, cada uma das cepas de *C. raciborskii* foram cultivadas em culturas mistas juntamente com a cepa de *M. aeruginosa* MIRF na proporção 1 : 1. As espécies nas culturas mistas permaneceram em contato por quatro dias e a proporção entre estas foi avaliada diariamente através de contagens ao microscópio óptico (Olympus BX41) com o auxílio de câmara de Neubauer. As culturas foram mantidas em meio Asm-1 (GORHAM et al., 1964), 100 μmol fótons $\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$ e fotoperíodo de 12:12 horas.

Ao final dos quatro dias, as culturas foram filtradas em aparato de filtração estéril e filtro fibra de vidro, poro 1,2 μm (Whatman, Inglaterra). Assim, se obteve os filtrados livres de células contendo os exudatos provenientes das monoculturas de *C. raciborskii* e da competição entre as sete cepas de *C. raciborskii* e MIRF. O

experimento foi realizado em placas de cultura de 24 poços com capacidade de 2,5 mL cada. Em cada poço foram adicionados 1,25 mL de meio Asm-1, 1,25 mL do filtrado obtido e 0,07 mL de cultura de MIRF afim de se obter uma concentração inicial de $10^7 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo “batch”), com somente uma adição inicial de filtrado, e de acordo com os seguintes tratamentos:

- a) Culturas de MIRF expostas a cada um dos filtrados das sete monoculturas de *C. raciborskii*.
- b) Culturas de MIRF expostas a cada um dos filtrados das sete culturas mistas.

Para controle negativo foi utilizado meio completo (1,25 mL de meio de crescimento Asm-1 + 1,25 mL de meio Asm-1 filtrado) com MIRF previamente inoculada na mesma concentração dos tratamentos. Devido ao prévio consumo de nutrientes pelos organismos na cultura de onde os filtrados foram proveniente, estes possuem menor quantidade de nutrientes do que o meio de cultura utilizado no controle. Desta forma, nutrientes foram adicionados (macronutrientes e elementos traço) aos filtrados a fim de corrigir um possível efeito causado pela limitação de nutrientes. Cada tratamento foi realizado em tréplicas e mantido a 25°C, 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12h .

2: Efeito do exudato de CYRF e MIRF na formação de colônias em diferentes cepas de *M. aeruginosa*

Previamente ao experimento, monocultura de CYRF e cultura mista com CYRF e MIRF na proporção 1 CYRF : 1 MIRF foram cultivadas. As espécies na cultura mista permaneceram em contato por quatro dias e a proporção entre estas foi avaliada diariamente por meio de contagem ao microscópio (Olympus BX41) com o auxílio de câmara de Neubauer. As culturas foram mantidas em meio Asm-1 (GORHAM et al., 1964), 100 μmol fótons $\text{m}^{-1}\text{s}^{-2}$ e fotoperíodo de 12:12 horas. Ao final dos quatro dias, as culturas foram filtradas em aparato de filtração estéril e filtro de fibra de vidro, poro 1,2 μm (Whatman, Inglaterra). Assim, obteve-se os filtrados livres de células contendo os exudatos provenientes da monocultura de CYRF e da competição entre CYRF e MIRF para serem adicionados em dez cepas de *M. aeruginosa* (Tab. 2). O experimento foi realizado em placas de cultura de 24 poços com capacidade de 2,5 mL cada. Em cada poço foram adicionados 1,25 mL de meio Asm-1, 1,25 mL do filtrado obtido e culturas de dez diferentes cepas de *M. aeruginosa* em concentração inicial de $10^7 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em cultivo fechado (tipo

“batch”), com somente uma adição inicial de filtrado e de acordo com os seguintes tratamentos:

A → Exudato da cultura mista de CYRF : MIRF (1 : 1) sobre:

1- MIRF (Controle positivo); 2- CYA43; 3- NPJB-1; 4- LEA-04; 5- PCC7806; 6- CYA140; 7- PCC7820; 8- NPLJ-4; 9- V131; 10- PCC7005.

B → Exudato da monocultura de CYRF (1 : 0) sobre cepas que formaram colônias em A.

Para controle negativo foi utilizado meio completo (1,25 mL de meio de crescimento Asm-1 + 1,25 mL de meio Asm-1 filtrado) com as cepas de *M. aeruginosa* previamente inoculadas na mesma concentração dos tratamentos. Nutrientes foram adicionados (macronutrientes e elementos traço) aos filtrados para corrigir o efeito causado pela limitação de nutrientes. Cada tratamento foi realizado em tréplicas e mantido a 25°C, 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12h .

Análise dos dados

As cepas de *M. aeruginosa* ficaram em contato com cada filtrado durante quatro dias. Ao final dos quatro dias, amostras foram retiradas e fixadas imediatamente com solução de lugol acético para análise da morfologia. Para cada tréplica, 100 células foram avaliadas e classificadas como colônias quando em um mínimo de três células agregadas. O tamanho das colônias também foi avaliado e essas foram classificadas como colônias pequenas (3 a 7 células por colônia) e colônias grandes (8 a 13 células por colônia).

Para ambos os experimentos, os tratamentos em que MIRF recebeu os exudatos das culturas mistas com 1 CYRF : 1 MIRF foram considerados controles positivos devido aos resultados encontrado em nosso estudo prévio (MELLO et al., *em prep.*).

A porcentagem do número de células em colônia de cada tratamento e o tamanho das colônias foram estatisticamente comparados usando análise de variância one-way ANOVA seguida por teste de Tukey (quando $p < 0,05$) com o auxílio do software Jump 5.0.1.

RESULTADOS

1: Efeito de diferentes cepas de *C. raciborskii* na formação de colônias em MIRF

As células de MIRF expostas a monoculturas de diferentes cepas de *C. raciborskii* não apresentaram resultados significativos para formação de colônias. O tratamento controle apresentou 18% de células em colônias, enquanto que os tratamentos T3 e PMC99.06 apresentaram 5% de células em colônias, os tratamentos G75, PMC124.02 e CS-1 apresentaram 16% de células em colônias, o tratamento Austr. apresentou 6% de células em colônias, e o tratamento CYRF apresentou 10% de células em colônias (Fig. 2.1).

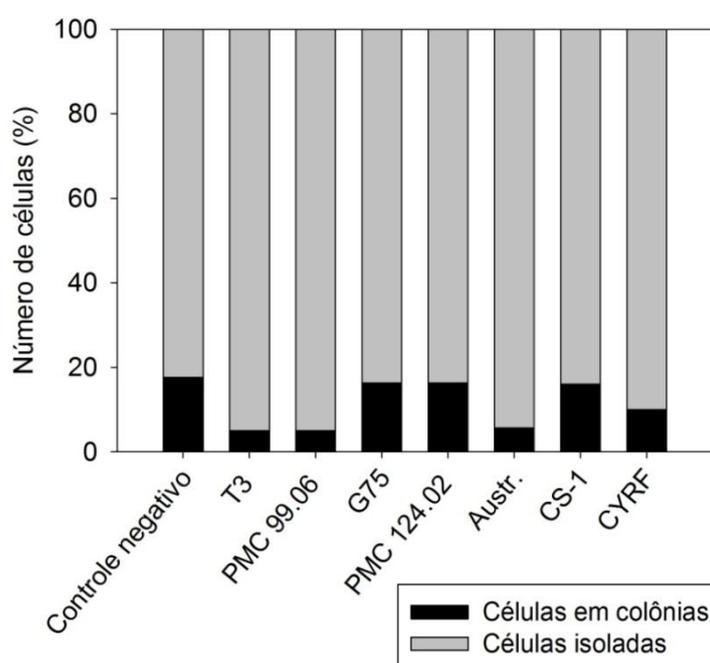


Figura 2.1. Porcentagem de células de MIRF isoladas e em colônias quando expostas a exudatos de monoculturas de sete cepas de *C. raciborskii*.

Os resultados das células de MIRF que foram expostas às culturas mistas foram divididos em dois grupos: I: onde não houve dados significativos de formação de colônias, e II: com dados significativos de formação de colônias ($F_{7,16} = 8,04$; $p < 0,001$) (Fig. 2.2), quando comparados aos controles negativo e positivo. No grupo I, o controle negativo e os tratamentos T3 e PMC99.06 apresentaram apenas 18%, 20% e 20% das células em colônias, respectivamente; enquanto que no grupo II, o controle positivo e os tratamentos G75, PMC124.02, Austr. e CS-1 apresentaram 58%, 49%, 50%, 50% e 59% das células em colônia, respectivamente.

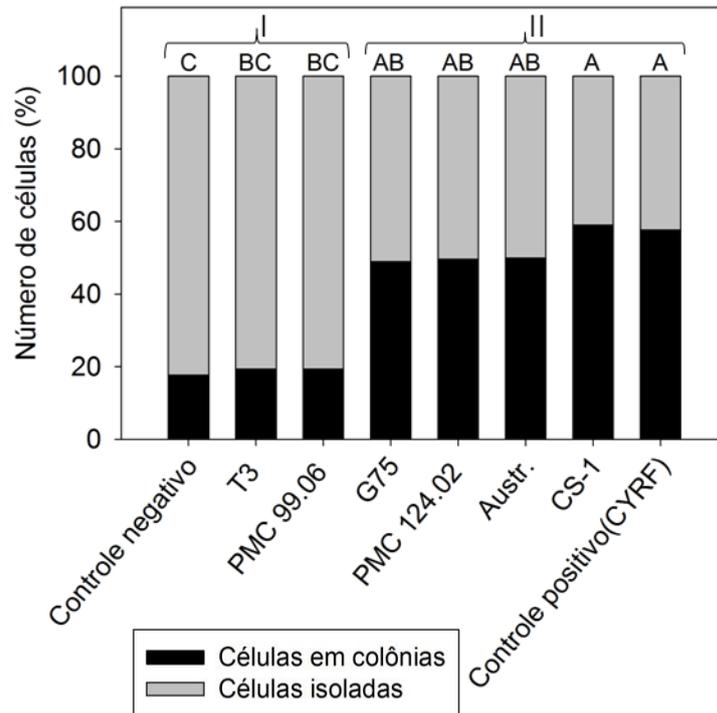


Figura 2.2. Porcentagem de células de MIRF isoladas e em colônias quando expostas a exudatos de sete cepas de *C. raciborskii* cultivadas em culturas mistas com MIRF. As letras maiúsculas sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$, em que letras diferentes representam diferença estatística.

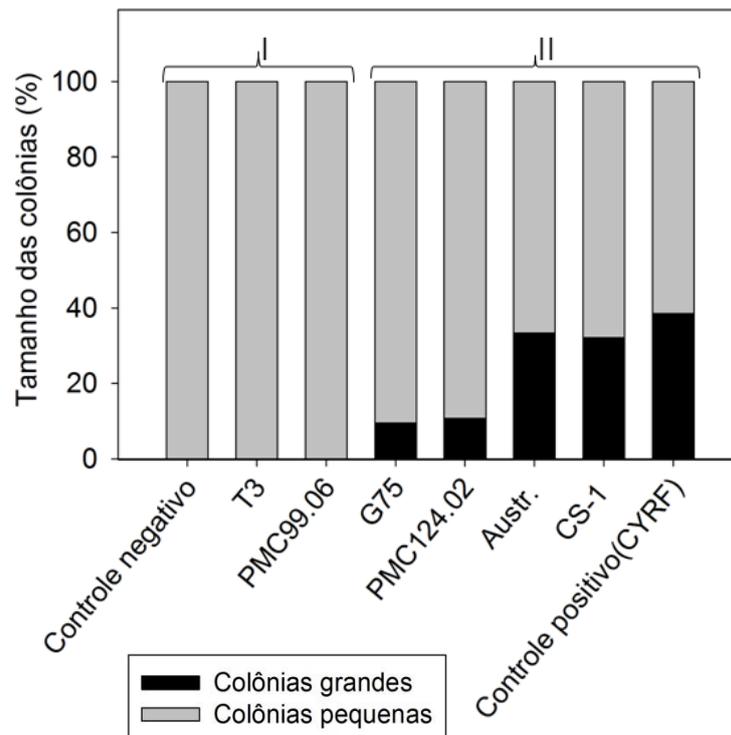


Figura 2.3. Tamanho das colônias (%) de MIRF quando exposta a exudatos de sete cepas de *C. raciborskii* cultivadas em culturas mistas com MIRF. Colônias pequenas = 3 a 7 células por colônia, colônias grandes = 8 a 13 células por colônia.

As diferenças no tamanho das colônias seguiram o padrão dos grupos observados na formação de colônias. O grupo I, que não formou número significativo de colônias, não apresentou colônias grandes, com 100% das colônias de todos os tratamentos desse grupo classificadas como pequenas (Fig. 2.3). No grupo II, em que a formação de colônias foi significativamente maior, observou-se a presença de colônias grandes, com 9,5% de colônias grandes em G75, 10,7% em PMC124.02, 33,3% em Austr., 32,1% em CS-1 e 38,4% de colônias grandes no controle positivo (Fig. 2.3).

2: Efeito do exudato de CYRF e MIRF na formação de colônias em diferentes cepas de *M. aeruginosa*

Ao final do experimento, dentre as dez cepas de *M. aeruginosa* que receberam o exudato proveniente da competição entre CYRF e MIRF, três, incluindo o controle positivo, formaram colônias. O controle positivo apresentou 55,3% das células em colônias e o controle negativo apenas 1% ($F_{1,2} = 78,14$; $p = 0,001$). As cepas PCC7806 e NPLJ-1 apresentaram 17,6% e 7,3% das células em colônias, respectivamente, enquanto a formação de colônias não foi observada em seus respectivos controles ($F_{1,2} = 28,95$; $p = 0,006$ e $F_{1,2} = 13,08$; $p = 0,022$, respectivamente). Para a cepa PCC7005, a formação de colônias também foi registrada. No entanto, esta não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle. As outras seis cepas testadas e seus respectivos controles não formaram colônias (Fig. 2.4).

Desta forma, para os experimentos B, apenas o controle positivo, PCC7806 e NPLJ-4 foram expostas ao exudato de monocultura de CYRF. As três cepas formaram colônias quando receberam o exudato (Fig. 2.5). Entretanto, somente PCC7806 apresentou dados de formação de colônias significativamente maior quando recebeu exudatos de monocultura de CYRF ($F_{2,6} = 20,08$; $p = 0,002$) (Fig. 2.5b). Para MIRF e NPLJ-4 (Fig. 2.5a e 2.5c, respectivamente), a porcentagem de células em colônias quando expostas à monocultura de CYRF foi menor do que quando expostas à cultura mista, apresentando 12,3% e 1% de células em colônias, respectivamente ($F_{2,6} = 43,58$; $p = 0,001$ e $F_{2,6} = 9,28$; $p = 0,014$, respectivamente). Diferentemente para a cepa mutante PCC7806, a porcentagem de células em colônia no tratamento 1 : 0 foi igual ao tratamento 1 : 1, apresentando 24% das células em colônia (Fig. 2.5b).

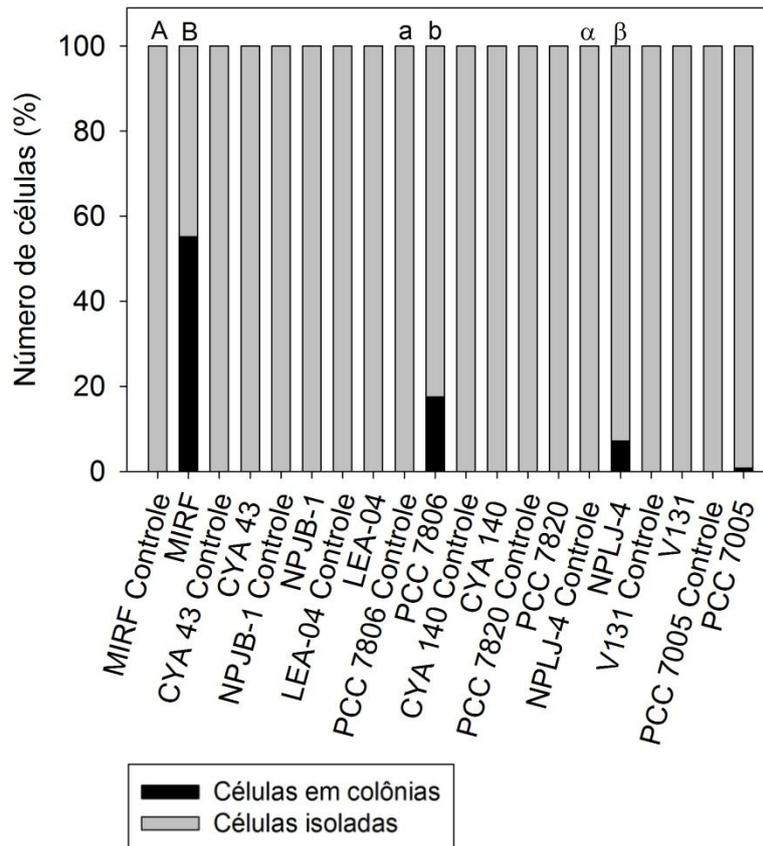


Figura 2.4. Porcentagem de células isoladas e em colônias nas dez cepas de *M. aeruginosa* quando expostas a exudatos da competição entre CYRF e MIRF. Letras sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$ (romanas maiúsculas para MIRF; romanas minúsculas para PCC7806; gregas minúsculas para NPLJ-4), em que letras diferentes dentro de cada classe de letras representam diferença estatística.

O tamanho das colônias foi analisado nos tratamentos que apresentaram formação significativa de colônias. Assim, os resultados apontaram que somente no controle positivo e na cepa PCC7806 (mutante) ocorreu a formação de colônias grandes. Ao final do experimento, 28,9% das colônias formadas do controle positivo foram classificadas como grandes. Em PCC7806, colônias grandes foram registradas no tratamento que recebeu exudato da cultura mista (30,5% de colônias grandes) e no tratamento que recebeu exudato de monocultura de CYRF (18,6% de colônias grandes) (Fig. 2.6)

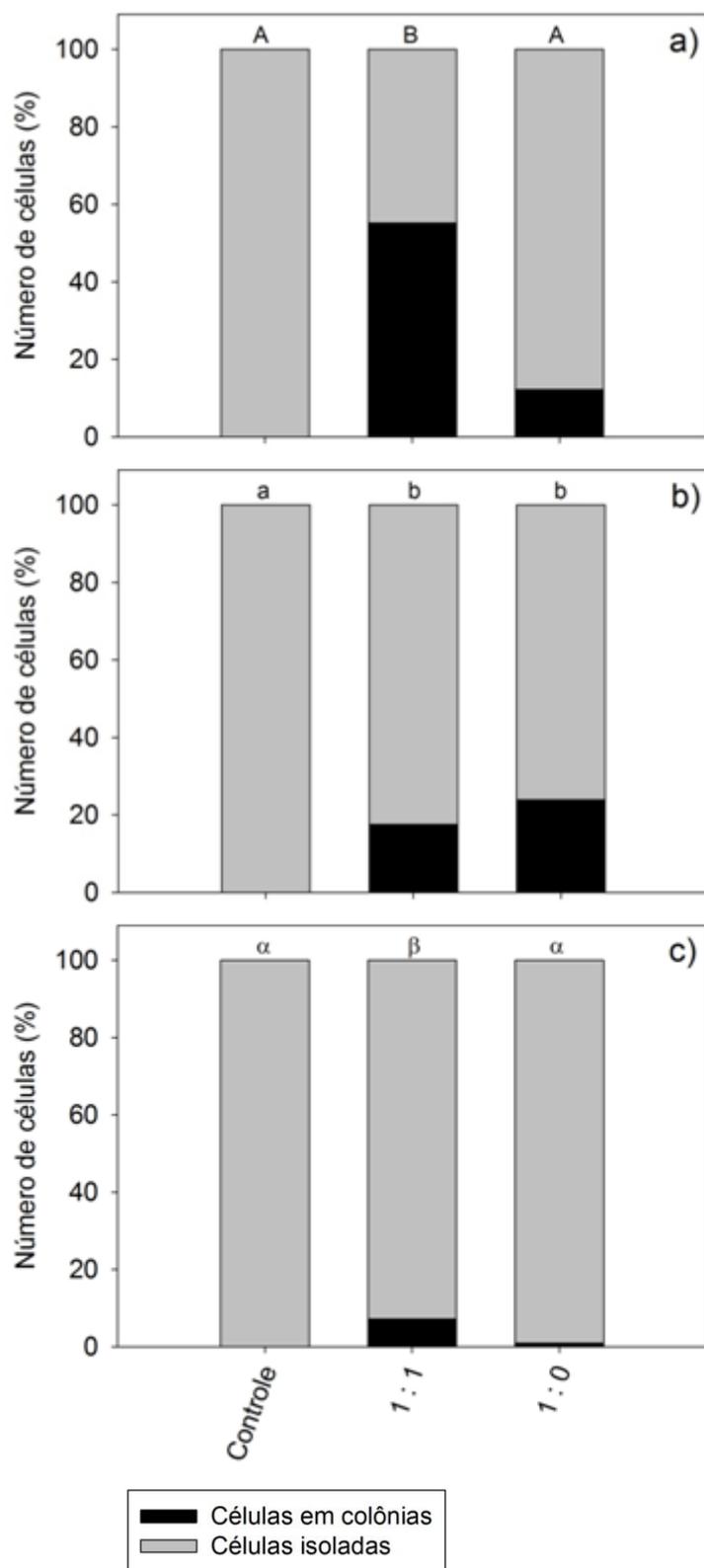


Figura 2.5. Porcentagem de células isoladas e em colônias em a) MIRF, b) PCC7806 e c) NPLJ-4 quando expostas a exudatos da competição entre CYRF e MIRF (1 : 1) e a exudatos da monocultura de CYRF (1 : 0). Letras sobre as barras representam o resultado da comparação estatística quando $p < 0,05$ (romanas maiúsculas para MIRF; romanas minúsculas para PCC7806; gregas minúsculas para NPLJ-4), em que letras diferentes dentro de cada classe de letras representam diferença estatística.

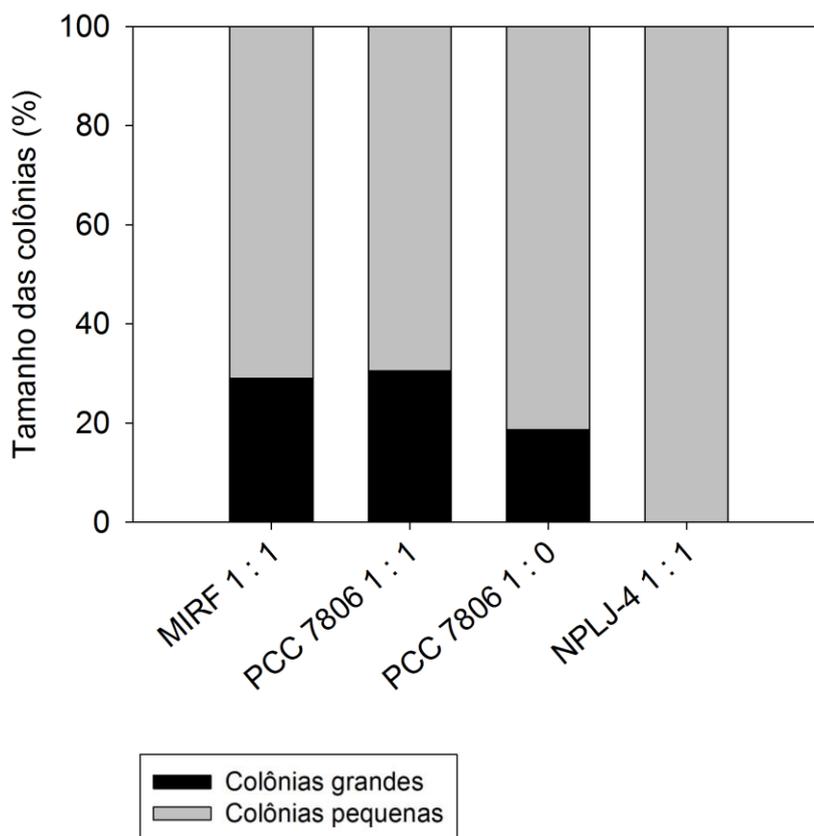


Figura 2.6. Tamanho das colônias (%) de *M. aeruginosa* nos tratamentos que apresentaram formação de colônias estatisticamente significativa. Colônias pequenas = 3 a 7 células por colônia, enquanto colônias grandes = 8 a 13 células por colônia.

DISCUSSÃO

1: Efeito de diferentes cepas de *C. raciborskii* na formação de colônias em MIRF

Dentre as sete cepas de *C. raciborskii* testadas, cinco (incluindo o controle positivo) foram capazes de promover a formação de colônias em MIRF. Esses dados indicam que a capacidade de responder a um estresse por meio de formação de colônias parece ser uma característica intrínseca de MIRF. A formação significativa de colônias em MIRF somente ocorreu quando esta foi exposta aos exudatos provenientes de culturas mistas. Isso aponta a necessidade de um fator de estresse, no caso competição, para induzir a possível produção de moléculas de *quorum sensing* para formação de colônias em MIRF. Mesmo nos casos em que cepas de *C. raciborskii* em competição com MIRF foram capazes de promover a formação de colônias, em nenhum caso o tratamento com monoculturas *C. raciborskii* foi capaz de induzir esse processo. A necessidade de um fator de estresse para a produção de moléculas de *quorum sensing* foi reportada em LAZZERA (2000). Neste trabalho, a produção de moléculas de *quorum sensing* pela bactéria *Bacillus subtilis* foi induzida

pela depleção de nutrientes, sinalizando para a entrada dessa população na fase estacionária de crescimento (ver Cap. 1).

A capacidade das cepas de *C. raciborskii* em induzirem a produção de moléculas de *quorum sensing* para formação de colônias em MIRF parece não estar relacionada com a capacidade destas de produzir toxinas. As cepas que compõem o grupo I, em que não houve formação de colônias, foram identificadas como produtoras (T3) e não-produtoras (PMC99.06) de toxinas. Da mesma forma, no grupo II, em que houve a formação de colônias, ocorrem cepas produtoras de toxinas (CYRF) e não-produtoras (CS-1). Assim, um padrão relacionado à produção de toxinas não pôde ser estabelecido. Diferenças na rota metabólica para produção de toxinas e de compostos alelopáticos vem sendo reportadas. Membros do gênero de dinoflagelados marinhos *Alexandrium* são bem conhecidos pela liberação de compostos alelopáticos e de neurotoxinas, no entanto, a liberação dos primeiros não está relacionada com a das segundas (MA et al., 2009). SUIKKANEN et al. (2006) mostraram também que o efeito alelopático da cianobactéria *Nodularia Spumigena* sobre a criptófita *Rhodomonas sp.* é mais provavelmente devido a metabólitos que não a cianotoxina (nodularina) produzida por essa espécie.

A origem geográfica das cepas de *C. raciborskii* também parece não estar relacionada com a produção de moléculas de *quorum sensing* por MIRF para formação de colônias. Cepas brasileiras foram relacionadas ao grupo I, bem como ao grupo II. NEILAN et al. (2003) analisaram a variação genética de cepas de *C. raciborskii* européias, brasileiras e australianas, e essas foram separadas em três grupos distintos. Nesse trabalho, a variação genética foi maior entre as cepas de continentes diferentes do que entre cepas de um mesmo país. Entretanto, no estudo de VALÉRIO et al. (2005), cepas de *C. raciborskii* provenientes de um mesmo país, Portugal, foram caracterizadas molecularmente e variação genética significativa foi encontrada. A produção de metabólitos secundários por cianobactérias é controlada pelas características genéticas de cada cepa (NEILAN et al., 2008). Sendo assim, segundo os trabalhos citados, a variação na produção de metabólitos secundários é esperada quando comparadas cepas de diferentes continentes. Da mesma forma, também é esperada variação na produção de metabólitos secundários entre cepas do mesmo país. Nossos resultados estão de acordo com os dados apresentados na literatura, já que duas cepas brasileiras foram capazes de induzir a formação de colônias, enquanto uma terceira cepa brasileira não induziu a formação significativa de colônias.

A variação no tamanho das colônias apresentou o mesmo padrão de variação na formação de colônias (Fig. 2.2). No estudo de LÜRLING (2003), a clorófito *Scenedesmus obliquus* formou colônias quando exposta ao filtrado de culturas do organismo zooplanctônico herbívoro *Daphnia magna*. O tamanho das colônias de *S. obliquus* foi relacionado positivamente à densidade de herbívoros na cultura de onde derivou o filtrado. Assim, quanto maior foi a densidade de herbívoros na cultura filtrada, maior foi a formação de colônias em *S. obliquus*, apresentando colônias com maiores tamanhos. Assim, extrapolando a relação predador-presa para dois autotróficos, os dados de LÜRLING (2003) suportam os encontrados em nosso trabalho, em que a frequência de ocorrência e tamanho das colônias foi diretamente relacionada.

2: Efeito do exudato de CYRF e MIRF Na formação de colônias em diferentes cepas de *M. aeruginosa*

Dentre as dez cepas de *M. aeruginosa* que receberam o exudato proveniente da competição entre CYRF e MIRF, somente MIRF e a mutante PCC7806 formaram colônias efetivamente. Apesar da cepa NPLJ-4 que recebeu exudatos da cultura mista ter apresentado formação significativa de colônias, esta não foi considerada efetiva por não ter apresentado colônias grandes. A ausência de formação de colônias grandes em NPLJ-4 (Fig. 2.6) aponta para um fraco efeito do exudato proveniente da competição entre CYRF e MIRF nesta cepa. Como foi visto no experimento 1, a formação de colônia foi significativa somente quando a presença de colônias grandes foi observada. Assim, no experimento 2, a formação de colônias somente foi considerada efetiva no controle positivo e na cepa mutante PCC7806.

A cepa mutante PCC7806 foi geneticamente transformada e teve sua capacidade inerente de produzir as variantes de microcistinas (toxinas) inibida, enquanto manteve a capacidade de sintetizar outros metabólitos secundários (DITTMANN et al., 1997). A mutação induzida em PCC7806 levou ao aumento de uma proteína de superfície relacionada à formação de colônias (MrpC) e, conseqüentemente, a uma maior tendência à formação de colônias na cepa mutante do que na cepa selvagem (ZILLIGES et al., 2008). Nesse trabalho, os autores ainda apontam a importância da proteína MrpC nas interações célula-a-célula em cepas de *Microcystis* produtoras de microcistina. Desta forma, em cepas onde a produção dessa proteína foi geneticamente alterada, é esperado um comportamento divergente dos

padrões esperados em cepas selvagens com relação a respostas de *quorum sensing* ou a aleloquímicos. Assim, em nosso estudo, parece pertinente a formação de colônias na cepa mutante PCC7806, enquanto todas as outras cepas testadas, exceto o controle positivo, não apresentaram formação efetiva de colônias. Além disso, quando comparamos a formação de colônias em 1 : 0 com 1 : 1, a mutante PCC7806 foi a única a não seguir o padrão de formação de colônia menor em 1 : 0. Este padrão foi seguido por todos os tratamentos que apresentaram formação de colônia neste experimento e no experimento 1. A formação de colônias em PCC7806 parece então estar mais relacionada a sua mutação genética e características dessa condição do que à capacidade de responder ao exudato da competição entre CYRF e MIRF. Diante disso, somente MIRF respondeu efetivamente ao exudato da competição entre CYRF e MIRF, indicando a co-evolução como um importante fator no desenvolvimento de defesas ou na capacidade de responder a sinais químicos. A formação de colônia em MIRF, induzida pelos exudatos provenientes da competição entre CYRF e MIRF, vem sendo apontada como um mecanismo de defesa contra os compostos aleloquímicos excretados por CYRF (MELLO et al., *em prep.*). Quando em concentração elevada, tais compostos podem causar inibição do crescimento. Entretanto, quando em concentrações intermediárias, a formação de colônias pode ser um primeiro sinal indicativo de defesa química (MELLO et al., *em prep.*).

Dados da literatura ainda não são suficientes para explicar o papel da co-evolução no desenvolvimento de mecanismos de defesa em interações fitoplanctônicas. Nossos resultados estão de acordo com os de YANG et al. (2009) , apesar desse trabalho tratar a interação de *M. aeruginosa* com predadores. Nesse estudo, a formação de colônias em *M. aeruginosa* foi testada expondo-a a exudatos de três tratamentos diferentes: filtrado de cultura com predadores alimentados com *M. aeruginosa*, filtrado de cultura com predadores alimentados com *M. wesenbergii* e filtrado de cultura com predadores alimentados com *Chlorella pyrenoidosa* (clorófito). A formação de colônias em *M. aeruginosa* somente ocorreu quando esta foi exposta ao filtrado da cultura onde os predadores foram alimentados com *M. aeruginosa*, indicando, assim, que as moléculas químicas para formação de colônia não são constituintes dos organismos envolvidos, mas relacionadas ao resultado das interações entre os organismos. Com relação à interação de cianobactérias e bactérias, MARTINS et al. (2010) testaram o efeito alelopático de 13 cepas de cianobactérias de quatro gêneros diferentes isoladas de uma estação de tratamento de esgoto sobre bactérias isoladas da mesma estação. Nenhuma das cepas de cianobactéria foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, sendo que dois dos gêneros

testados já foram reportados como capazes de inibir o crescimento de bactérias. Os autores relacionaram o resultado encontrado com a co-evolução das populações de bactéria e cianobactéria, levando ao estabelecimento de comunidades em que as populações não interferem no desenvolvimento uma da outra. Esses resultados corroboram o encontrado em nosso trabalho, em que cepas de *M. aeruginosa* que não co-evoluíram com CYRF, não foram capazes de desenvolver defesas (no caso, formação de colônias) contra os aleloquímicos de CYRF, relatados no capítulo 1.

CONCLUSÃO

A possível produção de moléculas para a formação de colônias em MIRF foi induzida pela competição com diferentes cepas de *C. raciborskii*. A formação de colônias em MIRF não teve relação com a toxicidade e origem das cepas de *C. raciborskii*.

Foi considerado que somente MIRF apresentou formação de colônias efetiva quando em contato com o exudato da competição entre CYRF e MIRF. Desta forma, o sinal para formação de colônia foi apontado como cepa-dependente, indicando a importância do papel da co-evolução nas interações alelopáticas entre cianobactérias.

A variação de respostas entre cepas da mesma espécie aponta para a necessidade de estudos ecológicos mais detalhados ao se tentar estabelecer padrões que expliquem florações de cianobactérias no ambiente. A co-evolução entre as espécies pode acarretar no desenvolvimento de defesas encontradas em uma cepa e não encontradas em outra. Assim, este trabalho aponta as interações entre cianobactérias como sendo ainda mais complexas do que vem sendo reportado. A identificação dos metabólitos secundários envolvidos nos processos de interação química e maiores estudos sobre o papel da co-evolução nessas interações podem ser uma ferramenta a mais na compreensão da variabilidade de respostas químicas entre cepas.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho apontam para a ocorrência de diferentes interações químicas entre as cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Tais interações parecem ser influenciadas por uma série de fatores, tanto bióticos quanto abióticos. A seguir, um sumário das principais idéias apresentadas:

- 1) *Cylindrospermopsis raciborskii* produziu aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de *M. aeruginosa* quando sob estresse por competição;
- 2) *Microcystis aeruginosa* produziu aleloquímicos capazes de inibir o crescimento de *C. raciborskii* quando sob estresse por competição e luz;
- 3) *Cylindrospermopsis raciborskii* demonstrou possuir a capacidade de se comunicar por *quorum sensing*, inibindo seu próprio crescimento, quando em situação de estresse por luz;
- 4) *Microcystis aeruginosa* demonstrou possuir a capacidade de se comunicar por *quorum sensing*, formando colônias, quando em situações de estresse por competição e luz;
- 5) O estresse por competição sob intensidades luminosas não indutoras de estresse em *C. raciborskii* parece ser mais deletério para o crescimento de *M. aeruginosa*, enquanto o estresse por luz parecer ser mais deletério para o crescimento de *C. raciborskii*;
- 6) Interações químicas aparentemente são uma vantagem competitiva a mais de cianobactérias, contribuindo para o sucesso ecológico de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* nos sistemas aquáticos brasileiros. No reservatório do Funil, interações químicas, juntamente com outros fatores, parecem contribuir para a dominância e o padrão de sucessão de cianobactérias;
- 7) A cepa de *M. aeruginosa* MIRF formou colônias quando em contato com exudatos de diferentes cepas de *C. raciborskii*;
- 8) A formação de colônias em MIRF não teve relação com a toxicidade e origem das cepas de *C. raciborskii*;

- 9) Dentre as dez cepas de *M. aeruginosa* testadas, somente MIRF apresentou formação de colônias quando em contato com o exudato da competição entre CYRF e MIRF, indicando a importância do papel da co-evolução nas interações químicas entre cianobactérias;
- 10) Diferentes respostas para cepas da mesma espécie aponta a necessidade de estudos ecológicos mais detalhados ao se tentar estabelecer padrões que expliquem florações de cianobactérias no ambiente;
- 11) A identificação dos metabólitos secundários envolvidos nas diferentes respostas de cada cepa é apontada como importante ferramenta para melhor compreender a variação química entre estas, sendo esta uma proposta para estudos futuros.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMACHO, F. A. Macroalgal and Cyanobacterial Chemical Defenses in Freshwater Communities. In: AMSLER, C. D. (ed.). **Algal Chemical Ecology**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 106-120, 2008.
- AZEVEDO, S. M. F. et al. Human health effects workgroup report. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, v. 619, p. 579-606, 2008.
- AZEVEDO, S. M. F. O. et al. 1st Report of Microcystins from a Brazilian Isolate of the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 3, p. 261-265, 1994.
- BECKER, S. Biotic factors in induced defence revisited: cell aggregate formation in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is triggered by spent Daphnia medium and disrupted cells. **Hydrobiologia**, v. 644, n. 1, p. 159-168, 2010.
- BERNARD, C. et al. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.
- BLOMQUIST, P. et al. Ammonium-Nitrogen - a Key Regulatory Factor Causing Dominance of Non-Nitrogen-Fixing Cyanobacteria in Aquatic Systems. **Archiv Fur Hydrobiologie**, v. 132, n. 2, p. 141-164, 1994.
- BOLCH, C. J. S.; BLACKBURN, S. I. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutz. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 1, p. 5-13, 1996.
- BORMANS, M. et al. Is buoyancy regulation in cyanobacteria an adaptation to exploit separation of light and nutrients? **Marine and Freshwater Research**, v. 50, n. p. 897-906, 1999.
- BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 13-27, 2000.
- BRIAND, J. F. et al. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, v. 40, n. 2, p. 231-238, 2004.
- BRIAND, J. F. et al. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, v. 36, n. 13, p. 3183-3192, 2002.
- CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria Secondary Metabolites - the Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W. W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

- CARNEIRO, R. L. et al. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, v. 1, n. p. 1-8, 2009.
- CASAMATTA, D. A.; WICKSTROM, C. E. Sensitivity of Two Disjunct Bacterioplankton Communities to Exudates from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing. **Microbial Ecology**, v. 40, n. 1, p. 64-73, 2000.
- CHAUHAN, V. S. et al. Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on phytoplankters, higher plants and mice. **New Phytologist**, v. 120, n. 2, p. 251-257, 1992.
- DITTMANN, E. et al., Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 779-787, 1997.
- DWORKIN, M. Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*". **Journal of Bacteriology**, v. 86, n. p. 67-72, 1963.
- DYBLE, J. et al. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. **African Journal of Marine Science**, v. 28, n. 2, p. 309-312, 2006.
- FEDERLE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 9, p. 1291-1299, 2003.
- FERRÃO-FILHO, A. D. et al. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 479-489, 2008.
- FIGUEREDO, C. C. et al. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 256-265, 2007.
- FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. 3. ed. Madison: The University of Wisconsin Press, 1987.
- GANTAR, M. et al. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **Fems Microbiology Ecology**, v. 64, n. 1, p. 55-64, 2008.
- GLEASON, F. K.; CASE, D. E. Activity of the natural algicide cyanobacterin on angiosperm. **Plant Physiology**, v. 80, n. p. 834-837, 1986.
- GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **International Association of Theoretical and Applied Limnology Proceedings**, v. 15, n. 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, n. 2, p. 135-145, 2003.
- GRANÉLI, E.; SALOMON, P. S. Factors Influencing Allelopathy and Toxicity in *Prymnesium Parvum*. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 46, n. 1, p. 108-120, 2010.

- GRANÉLI, E. et al. The Role of Allelopathy for Harmful Algae Bloom Formation. In: EVANGELISTA, V. (Eds.). **Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection**. Springer, Netherlands, 2008.
- GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 313-339, 2003.
- HA, K. et al. Colony formation in planktonic algae induced by zooplankton culture media filtrate. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 19, n. 1, p. 9-16, 2004.
- HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 408-424, 1999.
- HUSZAR, V.; DA SILVA, L. A Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudos. **Limnotemas**, v. 2, n. p. 1-22, 1999.
- IAS. INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. **Constitution**: Redigido durante o Primeiro Congresso Mundial de Alelopatia. A science for the future. Cadiz, Spain, 1996. Disponível em: <http://www.ias.uca.es/bylaws.htm#CONSTI>. Acesso em 28 fev 2009.
- KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **Fems Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KEARNS, K. D.; HUNTER, M. D. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. **Microbial Ecology**, v. 42, n. 1, p. 80-86, 2001.
- KEATING, K. I. Allelopathic Influence on Blue-Green Bloom Sequence in a Eutrophic Lake. **Science**, v. 196, n. 4292, p. 885-887, 1977.
- KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 249-258, 2006.
- KOMAREK, J. et al. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. **Cryptogamie Algologie**, v. 23, n. 2, p. 159-177, 2002.
- LAZZAZZERA, B. A. *Quorum sensing* and starvation: signals for entry into stationary phase. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 177-182, 2000.
- LEÃO, P. N. et al. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 3, p. 347-355, 2009.
- LEFLAIVE, J. et al. Colony induction and growth inhibition in *Desmodesmus quadricapsa* (Chlorococcales) by allelochemicals released from the filamentous alga *Uronema confervicolum* (Ulotrichales). **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1536-1546, 2008.
- LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, v. 52, n. 2, p. 199-214, 2007.

- LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Allelopathic interactions in benthic biofilms: effects of abiotic conditions on production of and sensitivity to allelochemicals. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 28, n. 2, p. 273-282, 2009.
- LEGRAND, C. et al. Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 406-419, 2003.
- LÜRLING, M. The effect of substances from different zooplankton species and fish on the induction of defensive morphology in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Plankton Research**, v. 25, n. 8, p. 979-989, 2003.
- LÜRLING, M.; BEEKMAN, W. Grazer-induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales; Chlorophyceae): coenobium and spine formation. **Phycologia**, v. 38, n. 5, p. 368-376, 1999.
- LÜRLING, M. et al. Importance of nutrient competition and allelopathic effects in suppression of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the macrophytes *Chara*, *Elodea* and *Myriophyllum*. **Hydrobiologia**, v. 556, p. 209-220, 2006.
- MA, H. Y. et al. Preliminary Characterization of Extracellular Allelochemicals of the Toxic Marine Dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* Using a *Rhodomonas salina* Bioassay. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 497-522, 2009.
- MARTINS, J. et al. Cyanobacteria and bacteria co-occurrence in a wastewater treatment plant: absence of allelopathic effects. **Water Science & Technology**, v. 62, n. 8, p. 1954-1962, 2010.
- MELLO, M. M. et al. Growth Inhibition and Colony Formation of the OF THE Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by the Filamentous Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em preparação.
- MIRANDA, M. A. C. N. **Efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento de duas cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju.** 2009. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.
- MULDERIJ, G. et al. Allelopathic growth inhibition and colony formation of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the aquatic macrophyte *Stratiotes aloides*". **Aquatic Ecology**, v. 39, n. 1, p. 11-21, 2005.
- NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial Bioluminescence: Its Control and Ecological Significance. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 4, p. 496-518, 1979.
- NEILAN, B. A. et al. Chapter 17: The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, v. 619, n. p. 417-452, 2008.
- NEILAN, B. A. et al. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 133-140, 2003.
- O'BRIEN, K. R. et al. Effects of light history on primary productivity in a phytoplankton community dominated by the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Freshwater Biology**, v. 54, n. 2, p. 272-282.

- OBERHAUS, L. et al. Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*". **Fems Microbiology Ecology**, v. 66, n. 2, p. 243-249, 2008.
- PADISAK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv Fur Hydrobiologie**, v. 4, p. 563-593, 1997.
- PAERL, H. W. et al. Harmful freshwater algal blooms, with emphasis on cyanobacteria. **Scientific World Journal**, v. 4, n. 1, p. 76-113, 2001.
- PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for *global expansion of harmful cyanobacterial blooms*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 1, p. 27-37, 2009.
- PARK, M. H. et al. Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. **Aquatic Botany**, v. 90, n. 4, p. 309-314, 2009.
- PARNAS, I. et al. Photoinactivation of Ichthyotoxin From Axenic Cultures of *Prymnesium parvum* Carter. **Applied Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 237-239, 1962.
- PETTERSON, K. et al. The role of *Gloeotrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in Lake Erken. **Hydrobiologia**, v. 253, n. p. 123-129, 1993.
- PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 407-413, 2002.
- PIRES, L. M. D. et al. Grazing on colonial and filamentous, toxic and non-toxic cyanobacteria by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 4, p. 331-339, 2005.
- PIRES, L. M. D. et al. Influence of toxic and non-toxic phytoplankton on feeding and survival of *Dreissena polymorpha* (Pallas) larvae. **Hydrobiologia**, v. 491, n. 1-3, p. 193-200, 2003.
- POMATI, F. et al. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (*Nostocales*). **Journal of Phycology**, v. 39, n. 3, p. 535-542, 2003.
- PUSHPARAJ, B. et al. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 6, p. 527-530, 1998.
- RAHAT, M.; JAHN, T. L. Growth of *Prymnesium parvum* in the Dark; Note on Ichthyotoxin Formation. **Journal Protozoology**, v. 12, n. 2, p. 246-250, 1965.
- RAPS, S. et al. Adaptation of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Light-Intensity". **Plant Physiology**, v. 72, n. 3, p. 829-832, 1983.
- READING, N. C.; SPERANDIO, V. *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. **Fems Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 1-11, 2006.

RENGEFORS, K.; LEGRAND, K. Toxicity in *Peridinium aciculiferum* – an adaptative strategy to outcompete other winter phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 46, n. p. 1990-1997, 2001.

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

REYNOLDS, C. S. et al. Cyanobacterial Dominance - the Role of Buoyancy Regulation in Dynamic Lake Environments. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, n. 3, p. 379-390, 1987.

ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T. *Microcystis aeruginosa* and Underwater Light Attenuation in a Hypertrophic Lake (Hartbeespoort Dam, South Africa). **Journal of Ecology**, v. 72, n. 3, p. 1001-1017, 1984.

ROBILLOT, C. et al. Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 16, p. 3372-3378, 2000.

ROMERO, M. et al. *Quorum quenching* activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase". **Fems Microbiology Letters**, v. 280, n. 1, p. 73-80, 2008.

SANTOS, M. E. V. **Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis* sp.** 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SCHAGERL, M. et al. Allelopathy among cyanoprokaryota and other algae originating from lake Neusiedlersee (Austria). **International Review of Hydrobiology**, v. 87, n. 4, p. 365-374, 2002.

SCHATZ, D. et al. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 965-970, 2007.

SCHLEGEL, I. et al. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 5, p. 471-479, 1998.

SCHMIDT, L. E.; HANSEN, P. J. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 216, n. p. 67-81, 2001.

SCHOPF, J. W. "The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage." In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (eds.), **The Ecology of Cyanobacteria**. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000.

SEDMAK, B. et al. Non-Toxic" cyclic peptides induce lysis of cyanobacteria - An effective cell population density control mechanism in cyanobacterial blooms. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 2, p. 201-209, 2008.

SHARIF, D. I. et al. *Quorum sensing* in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909". **Isme Journal**, v. 2, n. 12, p. 1171-1182, 2008.

SHILO, M. Formation and Mode of Action of Algal Toxins. **Bacteriological Review**, v. 31, n. 3, p. 180-193, 1967.

SINGH, D. P. et al. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 15-22, 2001.

SINGH, S. et al. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 73-95, 2005.

SMITH, V. H. Low Nitrogen to Phosphorus Ratios Favor Dominance by Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. **Science**, v. 221, p. 669-671, 1983.

SOARES, M. C. S. et al. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 137-149, 2009.

SOARES, R. M. et al. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions". **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 1-10, 2004.

STRAIGHT, P. D.; KOLTER, R. Interspecies Chemical Communication in Bacterial Development. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 99-118, 2009.

SUIKKANEN, S. et al. Allelopathy of Baltic Sea cyanobacteria: no evidence for the role of nodularin. **Journal of Plankton Research**, v. 28, n. 6, p. 543-550, 2006.

SUIKKANEN, S. et al. 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, n. 1, p. 85-101, 2004.

SUIKKANEN, S. et al. Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 287, p. 1-9, 2005.

TAN, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 954-979, 2007.

VALÉRIO, E. et al. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. **Harmful Algae**, v. 4, n. 6, p. 1044-1052, 2005.

VON ELERT, E.; JUTTNER, F. "Phosphorus limitation and not light controls the extracellular release of allelopathic compounds by *Trichormus doliolum* (cyanobacteria)". **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 8, p. 1796-1802, 1997.

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

WELKER, M. et al. Diversity of coexisting *Planktothrix* (Cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. **Archives of Microbiology**, v. 182, n. 4, p. 288-298, 2004.

WIEDNER, C. et al. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806". **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1475-1481, 2003.

WIELAND, A.; KUHL, M. Regulation of photosynthesis and oxygen consumption in a hypersaline cyanobacterial mat (Camargue, France) by irradiance, temperature and salinity". **Fems Microbiology Ecology**, v. 55, n. 2, p. 195-210, 2006.

YANG, Z. et al. Effect of Filtered Cultures of Flagellate *Ochromonas* sp. on Colony Formation in *Microcystis aeruginosa*". **International Review Hydrobiology**, v. 94, n. 2, p. 143-152, 2009.

YANG, Z. et al. Observation on colony formation of *Microcystis aeruginosa* induced by filtered lake water under laboratory conditions. **Annales De Limnologie-International Journal of Limnology**, v. 41, n. 3, p. 169-173, 2005.

ZILLIGES, Y. et al. An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2871-2879, 2008.