

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



SENSIBILIDADE DE CEPAS DE *Microcystis* SUBMETIDAS À COEXISTÊNCIA COM
Ceratophyllum demersum L.

Rafael Henrique de Moura Falcão

RECIFE

2019

Rafael Henrique de Moura Falcão

SENSIBILIDADE DE CEPAS DE *Microcystis* SUBMETIDAS À COEXISTÊNCIA COM
Ceratophyllum demersum L.

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura Plena em Ciências
Biológicas/UFRPE como requisito
parcial para obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Ariadne do
Nascimento Moura.

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F178s Falcão, Rafael Henrique de Moura
Sensibilidade de cepas de *Microcystis* submetidas à coexistência com *Ceratophyllum demersum* L / Rafael Henrique de Moura Falcão. - 2019.
41 f. : il.
- Orientador: Ariadne do Nascimento Moura.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2020.
1. Cianobactérias planctônicas. 2. Isoladas. 3. Alelopatia. 4. Experimento. I. Moura, Ariadne do Nascimento, orient.
II. Título

Rafael Henrique de Moura Falcão

**SENSIBILIDADE DE CEPAS DE *Microcystis* SUBMETIDAS À COEXISTÊNCIA
COM *Ceratophyllum demersum* L.**

Comissão Avaliadora:

Profª Drª Ariadne do Nascimento Moura – UFRPE
Orientador

Profª Drª Cláudia Ulisses de Carvalho Silva – UFRPE
Titular

MSc. Cihelio Alves Amorim – PPGB (UFRPE)
Titular

MSc. Anamaria Silva Diniz– PPGB (UFRPE)
Suplente

RECIFE

2019

DEDICATÓRIA

Dedico a mim, a minha família, aos amigos
que acreditam em mim, e aquelas pessoas
que duvidam do meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de iniciação científica durante dois anos. A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – minha segunda casa-, pelo apoio institucional, ao Programa de pós-Graduação em Botânica, pela disponibilização dos laboratórios para a realização das pesquisas, em especial, à Coordenadora Maria Tereza Buri, Cynara Leleu, ao seu Manassés (Seu Mano), e a todas as “tias” da limpeza.

Deixo aqui, registrado meus agradecimentos à Prof.^a Ariadne do Nascimento Moura, desde as canetas e chaveiros de suas viagens até o empréstimo de seu nome – na concessão de bolsas, submissão de resumos, e publicação de artigos. A senhora foi a Rainha deste jogo de xadrez, sei que não foi fácil me acompanhar, mas o pouco do tempo que dedicastes a mim foi fundamental, obrigado com estrelinhas!

Não posso deixar de agradecer aos companheiros do laboratório de Ficologia: Taxonomia e Ecologia de microalgas pela convivência, o Prof. Watson Arantes, Anamaria Diniz, Silvano Lima, ao Cihelio Amorim (meu querido Cici), que foi fundamental para minha construção e formação, obrigado por todos os momentos, foram arretados. Aos irmãos de iniciação científica o Vitor sem C (Ricardinho), à Celina Valença (minha querida Cel), sou grato por ter conhecido os dois, vivemos juntos momentos ruins e bons, desejo muito sucesso aos dois, quero um dia me esbarrar por ai e saber que suas conquistas foram grandes, vocês irão longe!

A minha querida família, as três estrelas da minha vida: minha avó Severina Moura (*in memorian*), minha mãe (Gerda Cristina), minha irmã (Roberta Moura), sou muito grato por tudo que fazem por mim, desde bancarem os meus “luxos” até me apoiarem nos momentos mais difíceis, e Beta, obrigado por ser essa mulher imparável, me inspiro muito em você. Obrigado!

A minha turma da UFRPE (LB3 2016.1.), obrigado galera, vocês são demais, é uma pena não poder colocar o nome de todos aqui, mas se sintam inclusos. Em especial, ao meu querido amigo João Antônio (Jaum), sou muito grato pelos momentos maravilhosos de diversão, compras, Dom coxinhas (vegan, rs.). Por fim, a banca, em especial à prof.^a Cláudia Ulisses, que disponibilizou um pouco do seu tempo de férias, para estar aqui contribuindo.

“Thank U, Next” (Ariana Grande)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
1.1. Florações de cianobactérias e presença das microcistinas na região Nordeste do Brasil.....	8
1.2. Macrófitas submersas como controladoras das florações de cianobactérias.....	9
1.3. Alelopatia e Aleloquímicos.....	10
1.4. Hipótese das novas armas e coevolução.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
MANUSCRITO: Sensitivity of <i>Microcystis</i> cepas - isolated from environments with the presence and absence of submersed macrophytes submitted to coexistence with <i>Ceratophyllum demersum</i> L.....	17
Abstract.....	18
Resumo.....	18
1. Introdução.....	19
2. Material e Métodos.....	22
2.1. Obtenção e cultivo das cepas de <i>Microcystis</i>	22
2.2. Obtenção e cultivo da macrófita <i>Ceratophyllum demersum</i>	23
2.3. Delineamento experimental.....	23
2.4. Crescimento da macrófita aquática.....	24
2.5. Taxas de Crescimento e Inibição.....	24
2.6. Análises estatísticas.....	25
3. Resultados.....	25
3.1. Efeitos de <i>C. demersum</i> sobre a biomassa das cepas de <i>Microcystis</i>	25
3.2. Efeitos de <i>C. demersum</i> sobre as taxas de crescimento e inibições das cepas de <i>Microcystis</i>	26
3.3. Crescimento de <i>C. demersum</i> após coexistência com cepas de <i>Microcystis</i>	29
4. Discussão.....	30
Agradecimentos.....	33
Referencias bibliográficas.....	33

Form and preparation of manuscripts.....	38
Send of the manuscripts.....	40

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Efeitos alelopáticos da macrófita aquática <i>C. demersum</i> sobre a biomassa de cepas de <i>M. aeruginosa</i> isoladas de ambientes com <i>C. demersum</i> (A e B), e cepas de <i>M. panniformis</i> isoladas de ambientes com ausência de <i>C. demersum</i> (C e D).....	27
Figura 2. Taxas de crescimento das cepas de <i>Microcystis</i> . Asteriscos indicam diferenças para cada cepa em relação ao tratamento controle e coexistência (two-way ANOVA, *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$).....	28
Figura 3. Taxas de inibições das cepas de <i>Microcystis</i>	29
Figura 4. Peso (g/L) inicial e final dos ramos de <i>C. demersum</i> submetidos a coexistência com as cepas de <i>Microcystis</i>	30

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de quatro cepas do complexo *Microcystis aeruginosa* Kützinger isoladas de reservatórios com a presença e ausência de macrófitas aquáticas submersas. Foi realizado um experimento de coexistência com as quatro cepas de cianobactérias, expostas à macrófita submersa *Ceratophyllum demersum* (ramos jovens e apicais – 7 g.L⁻¹) durante seis dias, sob condições controladas de laboratório em erlenmeyers com 500 mL de meio nutritivo ASM1. As cepas utilizadas pertencem às espécies *M. aeruginosa* (BMIUFRPE-06 e BMIUFRPE-07), isoladas do reservatório de Cajueiro (com a presença de macrófitas submersas) e *M. panniformis* (BMIUFRPE-08 e BMIUFRPE-09), isoladas do reservatório de Tapacurá (com ausência de macrófitas submersas). O controle consistiu no cultivo de cada cepa na ausência da planta, o que totalizou oito tratamentos com quatro réplicas cada. O crescimento da macrófita foi avaliado por meio da diferença entre o peso úmido inicial e final. Alíquotas de 2 mL foram coletadas a cada dois dias, para verificar os efeitos da planta sobre a densidade das cepas, por meio da contagem de células. Esses dados foram analisados entre os tratamentos e durante os dias de amostragem, com o uso do teste T de student para dados normais e o teste de Mann-Whitney para dados não normais. *Ceratophyllum demersum* apresentou crescimento em todos os tratamentos em que estava exposto às cepas de cianobactérias. Em contrapartida, o crescimento das cepas foi afetado de forma diferenciada. As cepas de *M. panniformis* isoladas de Tapacurá (BMIUFRPE-08 e BMIUFRPE-09) foram inibidas a partir do quarto dia de experimento, enquanto que, as cepas de *M. aeruginosa* (Cajueiro) foram menos afetadas: BMIUFRPE-06 apresentou o crescimento reduzido a partir do quarto dia até o final do experimento; no entanto, a BMIUFRPE-07 não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos no dia final. Desta forma, a presença de *C. demersum* no local de origem das cepas (Cajueiro) pode ser um fator atuante sobre a sensibilidade de *Microcystis* aos aleloquímicos da macrófita. A coexistência entre as cianobactérias e *C. demersum* no ambiente natural contribuiu para o crescimento diferenciado das cepas de *Microcystis* isoladas destes ambientes. Com isso, este estudo contribui para o entendimento das estratégias de biorremediação dos reservatórios de abastecimento público com florações de cianobactérias potencialmente tóxicas.

Palavras-chaves: Cianobactérias planctônicas; Isoladas; Alelopatia; Experimento

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

1.1. Florações de cianobactérias e presença das microcistinas na região Nordeste do Brasil.

Em ecossistemas aquáticos continentais, florações de cianobactérias tornaram-se frequentes nos últimos anos (PAERL; OTTEN, 2013), especialmente em decorrência do aumento da temperatura global e da eutrofização dos corpos hídricos (FALCONER, 2005). Estes microrganismos apresentam adaptações a diversas condições ambientais, toleram desde ambientes desérticos, hipersalinos, condições hipertermais e radiações ultravioletas, diante disso, são considerados cosmopolitas (PAERL; HUISMAN, 2009; CHATZIEFTHIMIOU et al., 2014; 2016).

A ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas proporciona problemas ambientais e de saúde pública (FALCONER, 2005; DAVIS; KOOP, 2006; PAERL; OTTEN, 2013; CARMICHAEL; BOYER, 2016), pelo fato de suas toxinas serem liberadas no ambiente após a lise celular, sendo esta a forma de intoxicação mais comum. Dentre as cianotoxinas produzidas pelas cianobactérias, destacam-se as anatoxinas, microcistinas, saxitoxinas, nodularinas, lingbiatoxinas, aplisiatoxinas e cilindrospermopsinas (CHORUS; BARTRAM, 1999; DITMANN et al., 2013; MOURA; ARAGÃO-TAVARES; AMORIM, 2017). Dentre os casos de intoxicação humana por cianotoxinas, a “Tragédia de Caruaru” foi o mais repercutido, essa tragédia ocorreu no município de Caruaru, Pernambuco, no ano de 1996, quando 130 pacientes foram submetidos à hemodiálise com água contaminada por microcistinas, dos quais 56 foram à obito (CARMICHAEL, et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002).

As microcistinas são as cianotoxinas mais frequentes em ecossistemas aquáticos de todo o mundo, e por isso são as mais estudadas (CHORUS; BARTRAM, 1999). Elas são hepatotoxinas que causam a morte de organismos em um curto intervalo de tempo, atuando diretamente na inibição da atividade das enzimas fosfatases 1 e 2 além de serem produzidas principalmente pelo gênero *Microcystis* (DITTMANN et al., 2013).

O gênero *Microcystis* está presente em corpos hídricos de todo o mundo (HARKE et al., 2016; BURATTI et al. 2017). Muitos estudos mostraram o predomínio de florações com a presença das microcistinas na região nordeste (CHELLAPPA; CHELLAPPA; CHELLAPPA, 2008; BITTENCOURT-OLIVEIRA; SANTOS; MOURA, 2010; MOURA; ARAGÃO-TAVARES; AMORIM, 2018). Em consequência dos fatores climáticos desta região, que

tornaram-se cada vez mais intensificados ao longo dos anos, a formação dessas florações tem sido favorecida, sendo influenciadas pela escassez de água, elevadas temperaturas, prolongado tempo de residência da água e o aumento da eutrofização artificial (MOURA; ARAGÃO-TAVARES; AMORIM, 2017).

1.2. Macrófitas submersas como controladoras das florações de cianobactérias

O termo Macrófita Aquática é utilizado para um grupo de vegetais visíveis a olho nu, que durante a sua evolução retornaram ao ambiente aquático, assim, desenvolveram uma ampla diversidade de hábitos, tais como: emersas, com folhas flutuantes, submersas enraizadas, submersas livres e flutuantes (CHAMBERS et al. 2008, ESTEVES, 2011). Segundo Chambers et al. (2008) a comunidade inclui representantes das algas (Chlorophyta, Xanthophyta, Rhodophyta, Cyanophyta), Bryophyta, samambaias e angiospermas.

As macrófitas aquáticas são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas aquáticos em lagos rasos eutróficos. Essas plantas contribuem para a manutenção do estado de águas claras (SCHEFFER et al., 1993; 2003), influenciam diretamente na ciclagem dos nutrientes, consumindo-os da água, desse modo, ficam indisponíveis para o fitoplâncton, retendo-os em suas raízes e folhas submersas (POTT; POTT, 2003). Além disso, também são capazes de reduzir a incidência de ondas internas e a ressuspensão do sedimento; fornecem refúgio ao zooplâncton e aos macroinvertebrados contra a predação por peixes (SCHEFFER et al. 1993; SØNDERGAARD; MOOS, 1998; MULDERIJ et al., 2007); e alteram propriedades físico-químicas da água, como por exemplo, as concentrações de oxigênio, pH e alcalinidade (CARACO; COLE, 2002).

Outro fator que contribui para a redução da biomassa fitoplanctônica, é a liberação de aleloquímicos. Estudos mostram que este fator é mais eficiente em relação a competição por nutrientes, pelo fato das macrófitas submersas absorverem os nutrientes do sedimento, e tornar os nutrientes da coluna d'água disponíveis para o fitoplâncton (SETO et al., 2013). A utilização de macrófitas alelopaticamente ativas é o método mais frequente para o controle das florações de cianobactérias em corpos d'água eutróficos (SVANYIS et al., 2014; LIU et al., 2018) especialmente de espécies potencialmente tóxicas.

O potencial alelopático de algumas espécies de macrófitas aquáticas já foi confirmado. Por exemplo, Nakai et al. (1999) identificaram os efeitos alelopáticos de oito macrófitas aquáticas sobre três espécies de cianobactérias formadoras de florações, por meio de experimentos de coexistência, nos quais haviam tratamentos com *Ceratophyllum demersum*

L. e *Microcystis aeruginosa* Kützing. A cepa de *Microcystis* foi inibida por todas as espécies de macrófitas, incluindo *C. demersum*.

1.3. Alelopatia e Aleloquímicos

A alelopatia foi definida por Rice (1984) como “qualquer efeito tóxico direto ou indireto de uma planta (incluindo microrganismos) em outra, através da produção de compostos químicos que escapam no ambiente”. Estes compostos químicos, conhecidos como aleloquímicos, são metabólitos secundários com determinadas características químicas, podendo ser flavonoides, terpenoides, esteroides, alcaloides e cianeto orgânico além de compostos fenólicos, com a finalidade de proteção (WHITTAKER; FEENY, 1971; GROSS, 1999; PFLUGMACHER, 2002). No caso das macrófitas aquáticas, as submersas são mais eficientes na liberação destes compostos quando em comparação com as emersas e flutuantes, pois sua morfologia (pequena quantidade de estômatos, cutículas reduzidas e conexões celulares estreitas) facilita a liberação de compostos (HUTCHINSON, 1975).

Os aleloquímicos são liberados na coluna d’água pelas folhas e caules, além de tricomas secretores, glândulas epidérmicas, ou associadas com a superfície das plantas (PFLUGMACHER, 2002; GROSS, 2003), e atingem os seus organismos alvos (no caso o fitoplâncton) em concentrações suficientes para ocasionar um efeito negativo, mesmo diluídos no meio aquático (GROSS, 2003). As plantas submersas liberam os aleloquímicos em resposta à competição com o fitoplâncton (HILT; GHOBRIAL; GROSS, 2006; MULDERIJ et al., 2006) e algas epifíticas (HILT, 2006). No entanto, para ambas as comunidades a alelopatia proporciona efeitos distintos, no caso da comunidade fitoplanctônica a inibição ocorre por meio da redução da atividade fotossintética (LEU et al. 2002; ZHU et al., 2010) e pelo estresse oxidativo (ZHANG et al., 2010; CHENG et al., 2017).

Dentre os estudos realizados, Zhu et al. (2010) verificaram a inibição de *M. aeruginosa* e *Selenastrum capricornutum* Printz pelos aleloquímicos da macrófita aquática *Myriophyllum spicatum* L. Svanys et al. (2014) mostraram uma redução de 48% da biomassa de cianobactérias em mesocosmos com a presença de *M. spicatum* em relação ao controle. Em contrapartida, a comunidade epifítica é mais resistente aos aleloquímicos, como demonstrado por Hilt (2006), que observou que *Stigeoclonium tenue* (C.Agardh) Kützing e *Oscillatoria limosa* C.Agardh - ambas espécies de cianobactérias epifíticas - foram mais resistentes aos aleloquímicos de *M. spicatum*, que espécies planctônicas, como por exemplo *M. aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, desse modo, as algas epifíticas podem ter coevoluido com seus hospedeiros para adquirir resistência aos aleloquímicos.

1.4. Hipótese das novas armas e coevolução

Muitos estudos têm abordado os efeitos da introdução de plantas exóticas sobre espécies nativas, mostrando que as plantas invasoras são capazes de restringir alelopaticamente outras populações que não estão adaptadas à presença dos compostos alelopáticos (GRIGULIS et al., 2001; RIDENOUR; CALLAWAY, 2001; LOUDA et al., 2003), sendo esta a premissa da hipótese das “novas armas” (CALLAWAY; ASCHEHOUG, 2000; CALLAWAY; RIDENOUR, 2004).

Esta hipótese prediz que as plantas possuem “armas” bioquímicas (os aleloquímicos) que afetam o crescimento de seus competidores. Portanto, quando uma determinada planta é introduzida em um novo ambiente, os competidores desse local não possuem mecanismos de defesa contra os aleloquímicos desta planta, visto que a comunidade nunca foi submetida a estes novos compostos químicos, com isso, são afetados negativamente. No entanto, quando ocorre o desenvolvimento destas plantas no local, seus competidores coevoluem junto com ela, e adquirem resistência aos seus aleloquímicos, pois, esses compostos tem o potencial de proporcionar estresses fisiológicos, que resultarão em mudanças genéticas na comunidade a longo prazo (MEALOR et al. 2004).

Alguns estudos demonstraram respostas diferenciadas à exposição de aleloquímicos em algumas cepas de cianobactérias, como por exemplo, Mulderij et al. (2005) verificaram que cepas tóxicas de *M. aeruginosa* são mais sensíveis aos aleloquímicos de *Stratioides aloides* L.. Em contrapartida, Švanys et al. (2016), identificaram uma maior sensibilidade nas cepas não tóxicas de *M. aeruginosa*, quando expostas ao ácido tânico. Essas respostas diferenciadas podem estar relacionadas à variabilidade genética destas cepas, o que favorece adaptações a diversas pressões ambientais, como por exemplo, a alelopatia. Outro fator que pode influenciar a sensibilidade destas cepas é a presença ou ausência de macrófitas nos locais de origem destas cepas.

Se tratando de espécies fitoplanctônicas, Eigemann et al. (2013) verificaram que para a alga verde *Pediastrum duplex* Meyen, a presença ou ausência de *M. spicatum* nos locais de origem das cepas isoladas não influenciaram na sensibilidade das mesmas, assim, sugerem que as cepas não se adaptaram aos aleloquímicos. Portanto, a sensibilidade é cepa-específica. Em contrapartida, Al-Shehri (2010) demonstrou que para a alga verde *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützinger, o local de origem das cepas influenciou na sensibilidade, uma vez que, a cepa originada de um lago com a presença de grandes bancos de *Stratiotes aloides* L. apresentou tolerância aos aleloquímicos desta macrófita, enquanto que uma cepa isolada de

um lago sem *S. aloides* foi extremamente afetada pela macrófita, apresentando reduções no crescimento e estresse oxidativo.

No entanto, ainda se tem registros de estudos que abordam a coevolução das cianobactérias aos aleloquímicos das macrófitas aquáticas, especialmente para cepas de *Microcystis*, que tornou-se uma cianobactéria cosmopolita (HARKE et al., 2016), devido a sua longa história evolutiva, deste modo, persiste às diversas mudanças geoquímicas e climáticas do planeta, até os dias atuais (PAERL, 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AL-SHEHRI, A.M. Differential sensitivities of different *Scenedesmus obliquus* strains to the allelopathic activity of the macrophytes *Stratiotes aloides*. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 1769-1774, 2010
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.
- BURATTI, F. M.; MANGANELLI, M.; VICHI S.; STEFANELLI M.; SCARDALA S.; TESTAI M.; FUNARI E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1049-1130, 2017.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; SANTOS, D. M. S.; MOURA, A. N. Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using a molecular method. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1005–1010, 2010.
- CALLAWAY, R.M.; ASCHEHOUG, E.T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 521-523, 2000.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 8, p. 436-443, 2004.
- CARACO, N. F.; COLE, J.J. Contrasting impacts of a native and alien macrophyte on dissolved oxygen in large river. **Ecology**, V. 12, p. 1496–1509, 2002.
- CARMICHAEL, W. W.; BOYER, G. L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. **Harmful Algae**, v. 54, p.194-212, 2016.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M.; AN, J. S.; MOLICA, R. J.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CHAMBERS, P. A.; LACOUL, P.; MURPHY, K. J.; THOMAZ, S. M. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p.9-26, 2008.

CHATZIEFTHIMIOU, A. D.; RICHER, R. A.; ROWLES, H.; POWELL, J. T.; METCALF, J. S. Cyanotoxins as a potential cause of dog poisoning in desert environments. **Veterinary Record**, v. 174, n. 19, p. 484-485, 2014.

CHATZIEFTHIMIOU, A. D.; METCALF, J. S.; GLOVER, W. B.; BANACK, S. A.; DARGHAM, S. R.; RICHER, R. A. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. **Toxicon**, v. 114, p. 75-84, 2016.

CHELLAPPA, N. T.; CHELLAPPA, S. L.; CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. **Brazilian archives of Biology and technology**, v. 51, n. 4, p. 633-641, 2008.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1999.

DAVIS, R.; KOOP, K. Eutrophication in Australian rivers, reservoirs and estuaries – a southern hemisphere perspective on the science and its implications. **Hydrobiologia**, v. 559, p. 23–76, 2006.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 23-43, 2013.

EIGEMANN, F.; HILT, S.; SCHMITT-JANSEN, M. Flow cytometry as a diagnostic tool for the effects of polyphenolic allelochemicals on phytoplankton. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 5-14, 2013.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de limnologia**. (3. ed.) Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 826p.

FALCONER, I. R. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply?. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 33, n. 1, p. 64-71, 2005.

GRIGULIS, K.; SHEPPARD, A.W.; ASH, J.E; GROVES, R.H. The comparative demography of the pasture weed *Echium plantagineum* between its native and invaded ranges. **Journal of Applied Ecology**, v. 38, n. 2, p. 281-290, 2001.

- GROSS, E. Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. In. INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Eds.). Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions. Boca Raton: CRC press, 1999. p. 179-199.
- GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 313-339, 2003.
- HARKE, M. J.; STEFFEN, M. M.; GOBLER, C. J.; OTTEN, T. G.; WILHELM, S. W.; WOOD, S. A.; PAERL, H. W. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v.54, p. 4– 20, 2016.
- HILT, S. Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. **Aquatic Botany**, v. 85, n. 3, p. 252-256, 2006.
- HILT, S.; GHOBRIAL, M.G.N.; GROSS, E.M. In situ allelopathic potential of *Myriophyllum verticillatum* (Haloragaceae) against selected phytoplankton species. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 6, p. 1189-1198, 2006.
- HUTCHINSON, G. E. A Treatise of Limnology. **Limnological botany**, v.3, 1975.
- LEU, E.; Krieger-Liszkay, A.; Goussias, C.; Gross, E. M. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2011-2018, 2002.
- LIU, Z. et al. Successful restoration of a tropical shallow eutrophic lake: Strong bottom-up but weak top-down effects recorded. **Water research**, v. 146, p. 88-97, 2018.
- LOUDA, S. M.; PEMBERTON, R. W.; JOHNSON, M. T.; FOLLETT, P. Nontarget effects—the Achilles' heel of biological control? Retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. **Annual review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 365-396, 2003.
- MEALOR, B. A.; HILD, A. L.; SHAW, N. L. Native plant community composition and genetic diversity associated with long-term weed invasions. **Western North American Naturalist**. V. 64 (4)p. 503-513, 2004.
- MOURA, A. N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K.C.; AMORIM, C. A. Cyanobacterial blooms in freshwater bodies in a semiarid region, northeastern Brazil: A review. **Journal of Limnology**, 2017.
- MULDERIJ, G.; MOOIJ, W. M.; SMOLDERS, A. J. P.; VAN DONK, E. Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides*. **Aquatic Botany**, v. 82, n. 4, p. 284-296, 2005.

MULDERIJ, G.; SMOLDERS, A. J. P.; VAN DONK, E. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. **Freshwater Biology**, v. 51, n. 3, p. 554-561, 2006.

MULDERIJ,; VAN NES, E. H.; VAN DONK, E. Macrophyte–phytoplankton interactions: the relative importance of allelopathy versus other factors. **Ecological modelling**, v. 204, n. 1-2, p. 85-92, 2007.

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.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 995-1010, 2013.

PAERL, H. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human and climatically impacted world. *Life*, v. 4, n. 4, p. 988-1012, 2014.

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.

POTT, V. J.; POTT, A. Dinâmica da vegetação aquática do Pantanal. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**, v. 1, p. 145-162, 2003.

RICE, E.L. Allelopathy. **Academic Press**, Orlando, Florida, 1984.

RIDENOUR, W. M.; CALLAWAY, R. M. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. **Oecologia**, v. 126, n. 3, p. 444-450, 2001.

SCHEFFER, M.; HOSPER, S. H.; MEIJER, M. L.; MOSS, B.; JEPPESEN E. Alternative equilibria in shallow lakes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 275– 279, 1993.

SCHEFFER, M.; SZABO, S.; GRAGNANI, A.; VANES, E.H.; RINALDI, S.; KAUTSKY, N.; NORBERG, J.; ROIJACKERS, R.M.M.; FRANKEN, R.J.M. Floating plant dominance as a stable state. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**, v. 100, n.7, p.4040–4045, 2003.

SETO, M.; TAKAMURA, N.; IWASA, Y. Individual and combined suppressive effects of submerged and floating-leaved macrophytes on algal blooms. **Journal of theoretical biology**, v. 319, p. 122-133, 2013.

SØNDERGAARD, M.; MOSS, B. Impact of Submerged Macrophytes on Phytoplankton in Shallow Freshwater Lakes. In: JEPPESEN, E.; SØNDERGAARD, MA, SØNDERGAARD, M.O.; CHRISTOFFERSEN, K. (eds), *The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes*. **Springer**, New York, 1998. pp. 115–132.

- ŠVANYS, A.; EIGEMANN, F.; GROSSART, H. P.; HILT, S. Microcystins do not necessarily lower the sensitivity of *Microcystis aeruginosa* to tannic acid. **FEMS microbiology letters**, v.363, n.2, 2016.
- ŠVANYS, A.; PAŠKAUSKAS, R.; HILT, S. Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: a mesocosm study. **Hydrobiologia**, v. 737, n. 1, p. 57-66, 2014.
- WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.
- ZHANG, D.; XIE, P.; CHEN, J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 84, n. 2, p. 202-207, 2010.
- ZHU, J.; LIU, B.; WANG, J.; GAO, Y.; WU, Z. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. **Aquatic toxicology**, v. 98, n.2, p. 196-203, 2010

Sensitivity of *Microcystis* strains isolated from environments with the presence and absence of submerged macrophytes to the coexistence with *Ceratophyllum demersum* L.

Sensibilidade de cepas de *Microcystis* isoladas de ambientes com presença e ausência de macrófitas submersas em coexistência com *Ceratophyllum demersum* L.

Rafael Henrique de Moura-Falcão¹, Ariadne do Nascimento Moura^{2*}

¹Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Departamento Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Brazil.

*email: ariadne_moura@hotmail.com

Authors information:

RHMF – ORCID 0000-0001-5605-177X, Email rafaelhenriquefalcao@hotmail.com;

ANM – ORCID 0000-0001-5093-2840, Email ariadne_moura@hotmail.com.

Artigo será submetido à **Acta Limnologica Brasiliensia**

Abstract

Aim: To evaluate the sensitivity of four strains of *Microcystis* complex isolated from reservoirs with the presence and absence of submerged aquatic macrophytes. **Methods:** Two treatments were determined for each strain, one coexisting with the addition of young and apical branches of *C. demersum* (7 gL^{-1}) and one control (absence of macrophyte). Both were grown in ASM1 medium under controlled laboratory conditions for six days with eight treatments and three replicates. Two strains of *Microcystis aeruginosa* and two strains of *Microcystis panniformis* were used. The biomass and growth rates of the strains were evaluated every two days and compared by T-test and ANOVA, respectively. **Results:** The macrophyte promoted different responses in coexistence with *Microcystis* strains. *M. aeruginosa* strains - isolated from environments with the presence of submerged macrophytes - showed growth retardation compared to their respective controls, BMIUFRPE-06 and BMIUFRPE-07 biomass was reduced by 43.85% ($p > 0, 05$) and 57.63% ($p > 0.05$), respectively, both showed positive values in the growth rates (0.10 d^{-1} and 0.30 d^{-1}). The *M. panniformis* strains from *C. demersum* absent environments were inhibited, BMIUFRPE-08 was the most affected strain, with inhibition values of 96.26% ($p < 0.01$), besides presenting growth rate negative (-0.04 d^{-1}), then BMIUFRPE-09 was inhibited by 74.31% ($p < 0.05$) showing the lowest positive growth rate (0.01 d^{-1}). *Ceratophyllum demersum* increased their weight in the coexistence treatments between the beginning and the end of the experiment, which showed significant differences ($p < 0.05$) with the strains BMIUFRPE-06 and BMIUFRPE-09; $p < 0.01$ (BMIUFRPE-08) and $p < 0.001$ (BMIUFRPE-07). **Conclusions:** *Microcystis* strains isolated from macrophyte-free environment were inhibited, while strains isolated from environments with submerged plants were less sensitive and showed growth retardation.

Keywords: Experiment; Cyanobacteria; *Microcystis* Complex; allelopathy.

Resumo

Objetivo: Avaliar a sensibilidade de quatro cepas do complexo *Microcystis* isoladas de reservatórios com a presença e ausência de macrófitas aquáticas submersas. **Métodos:** Foram determinados dois tratamentos para cada cepa, um de coexistência com a adição de ramos jovens e apicais de *C. demersum* (7 gL^{-1}) e um controle (ausência da macrófita). Ambos cultivados em meio ASM1, sob condições laboratoriais controladas, durante seis dias, com oito tratamentos e três réplicas. Foram utilizadas duas cepas de *Microcystis aeruginosa* e duas de *Microcystis panniformis*. As biomassas e taxas de crescimento das cepas foram avaliadas a

cada dois dias e comparadas pelo teste-T e ANOVA, respectivamente. **Resultados:** A macrófita promoveu diferentes respostas em coexistência com as cepas de *Microcystis*. As cepas de *M. aeruginosa* - isoladas de ambientes com a presença de macrófitas submersas - apresentaram retardos no crescimento em comparação com os respectivos controles, a biomassa da BMIUFRPE-06 e BMIUFRPE-07 foi reduzida em 43,85% ($p > 0,05$) e 57,63% ($p > 0,05$), respectivamente, ambas apresentaram valores positivos nas taxas de crescimento ($0,10 \text{ d}^{-1}$ e $0,30 \text{ d}^{-1}$). As cepas de *M. panniformis* provenientes de ambientes ausentes de *C. demersum* foram inibidas, a BMIUFRPE-08 foi a cepa mais afetada, com valores de inibição de 96,26% ($p < 0,01$), além de apresentar taxa de crescimento negativa ($-0,04 \text{ d}^{-1}$), em seguida BMIUFRPE-09 foi inibida em 74,31% ($p < 0,05$) apresentando a menor taxa de crescimento positivo ($0,01 \text{ d}^{-1}$). *Ceratophyllum demersum* aumentou seu peso nos tratamentos de coexistência entre o dia inicial e final do experimento, a qual apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), com as cepas BMIUFRPE-06 e BMIUFRPE-09; $p < 0,01$ (BMIUFRPE-08) e $p < 0,001$ (BMIUFRPE-07). **Conclusões:** As cepas de *Microcystis* isoladas do ambiente livre de macrófitas foram inibidas, enquanto que as cepas isoladas de ambientes com a presença de plantas submersas foram menos sensíveis e apresentaram retardo no crescimento.

Palavras-chave: Experimento; Cianobactérias; Complexo *Microcystis*; alelopatia.

1. Introdução

Os ecossistemas aquáticos apresentam dois estados alternativos principais, o claro, que dispõe de uma ampla biomassa de macrófitas aquáticas, e o turbido, caracterizado pela elevada biomassa fitoplanctônica e reduzida cobertura de macrófitas aquáticas (SCHEFFER, 1990; SCHEFFER et al., 1993; 2001). Em águas turvas, é frequente a ocorrência de florações ou “*blooms*” de cianobactérias, geralmente em decorrência das mudanças climáticas e da eutrofização antrópica (BERGER et al., 2008; DOLMAN et al., 2012; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; MOURA; ARAGÃO-TAVARES; AMORIM, 2018).

Essas florações afetam negativamente os reservatórios de abastecimento público por meio da liberação de cianotoxinas, que comprometem a qualidade da água, reduzem

atividades recreativas e pesqueiras (DAVIS; KOOP, 2006). Dentre as toxinas, as microcistinas são as cianotoxinas mais estudadas e frequentes nos ambientes aquáticos, as quais foram relatadas em 79 países (HARKE et al. 2016). Além disso, existem mais de 240 variantes de microcistinas, os quais diferem em níveis de letalidade (SVIRČEV et al., 2017), e ocasionam danos às macrófitas aquáticas (AMORIM; ULISSES; MOURA, 2017), zooplâncton (LIANG et al., 2017), peixes (BOARU; DRAGOS; SCHIRMER, 2006) e até o homem (CARMICHAEL et al., 2001).

No Brasil, a região semiárida, apresenta condições climáticas e níveis de eutrofização que favorecem o desenvolvimento de florações potencialmente tóxicas de cianobactérias (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; MOURA; ARAGÃO-TAVARES; AMORIM, 2018). Desse modo, muitos estudos mostram a recorrência dessas florações nessa região (PANOSSO, et al., 2007; CHELLAPPA; CHELLAPPA; CHELLAPPA, 2008; BITTENCOURT-OLIVEIRA; SANTOS; MOURA, 2010; PICCIN-SANTOS; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012). A introdução de macrófitas aquáticas submersas tem fornecido bons resultados na redução dessas florações (p.e. DONG et al., 2014), através do fornecimento de refúgio a comunidade zooplânctonica (JEPPESEN et al., 1997), competição por luz, nutrientes, e exsudação de aleloquímicos (GROSS, 2003; HILT; GROSS, 2008; EIGEMANN; HILT; SCHIMITT-JANSEN, 2013).

A alelopatia pode ocorrer entre plantas nos ambientes terrestres e aquáticos, por meio da interação bioquímica entre elas (PFLUGMACHER, 2002) com o objetivo de afetar os seus competidores no ecossistema, e interferir em sua fisiologia (REIGOSA et al., 1999; GROSS, 2009). Nesse sentido, Rice (1984) define a alelopatia como “qualquer efeito tóxico direto ou indireto de uma planta (isto inclui os microrganismos) em outra, através da produção de compostos químicos que escapam no ambiente”.

Esses compostos químicos são metabólitos secundários com a finalidade de proteger as plantas contra os seus efeitos (WHITTAKER; FEENY, 1971; GROSS, 1999; PFLUGMACHER, 2002). As macrófitas aquáticas de hábito submerso são mais eficientes na liberação de aleloquímicos, pois sua morfologia (ausência de estômatos, cutículas reduzidas e conexões celulares mais estreitas) contribui na liberação desses compostos (HUTCHINSON, 1975). Esses aleloquímicos são liberados diretamente na coluna d'água pelas folhas e caules, ou por aparatos associados à superfície das plantas, como tricomas secretores e glândulas epidérmicas (PFLUGMACHER, 2002; GROSS, 2003). Desta forma, atingem os seus organismos alvos (o fitoplâncton) em concentrações suficientes para promover um efeito negativo, mesmo diluído no meio aquático (GROSS, 2003).

Diversos trabalhos demonstraram a inibição de cianobactérias por meio dos aleloquímicos de macrófitas aquáticas. Por exemplo, Mohamed (2017), mostrou que mais de 40 macrófitas aquáticas são capazes de inibir o fitoplâncton, por meio da alelopatia. A maior parte destes estudos foram realizados com *Microcystis* (p.e. HILT; GHOBRIAL; GROSS, 2006; CHANG; EIGEMANN; HILT, 2012; ŠVANYS; PAŠKAUSKAS; HILT, 2014). No entanto, este gênero apresenta uma ampla variabilidade em resposta aos aleloquímicos das macrófitas, por exemplo, linhagens não produtoras de microcistinas são mais sensíveis aos compostos químicos destas plantas (ŠVANYS et al., 2016)

Outras populações de algas apresentam uma diversidade genética que lhes permitem se adaptar às condições encontradas nos ambientes em que ocorrem, como resistência aos poluentes (BEHRA; GENONI; JOSEPH, 1999), ou à pressão de predação pelo zooplâncton (VANORMELIGEN et al., 2009). Para *Microcystis aeruginosa* Kützinger, alguns estudos mostram que a variabilidade genética entre as cepas é favorável na adaptação a diversas pressões ambientais, no entanto as respostas só foram testadas entre cepas tóxicas e não tóxicas. Por exemplo, cepas não tóxicas são melhores competidoras por luz (KARDINÄAL et

al., 2007), enquanto que cepas tóxicas são favorecidas em condições de elevadas temperaturas e nutrientes (DAVIS et al., 2009).

Outro fator que pode influenciar na sensibilidade das algas, é a sua origem, como descrito pela “hipótese das novas armas”, a qual prediz que plantas invasoras são eficientes controladoras de populações de espécies nativas quando introduzidas em novos ambientes (CALLAWAY; ASCHEHOUG, 2000; CALLAWAY; RIDENOUR, 2004). Entretanto, com o passar do tempo às espécies nativas podem coevoluir com as plantas exóticas, quando começam a se desenvolver no novo local (REIGOSA; SANCHEZ-MOREIRAS; GONZALEZ, 1999). Alguns estudos abordaram a ocorrência da coevolução de algas epífitas, incluindo cianobactérias (HILT, 2006), e planctônicas, como *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing (AL-SHEHRI, 2010), em resposta aos aleloquímicos de plantas aquáticas.

Com isto, o presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de quatro cepas do complexo *Microcystis* isoladas de reservatórios com a presença e ausência de macrófitas aquáticas submersas. Dessa forma, levantamos a hipótese de que as cepas isoladas do ambiente com a ausência de plantas submersas é mais sensíveis aos aleloquímicos de *C. demersum*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção e cultivo das cepas de *Microcystis*

Foram utilizadas nos experimentos quatro cepas de cianobactérias do complexo *Microcystis aeruginosa*: duas cepas de *M. aeruginosa* (BMIUFRPE-06 e BMIUFRPE-07) e duas de *M. panniformis* Komárek et al. (BMIUFRPE-08 e BMIUFRPE-09), as quais foram identificadas e isoladas em amostras de campos, por meio de literatura especializada (NGUYEN et al., 2012; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1986).

Duas cepas foram isoladas do reservatório de Tapacurá localizado no município de São Lourenço da Mata - PE (BMIUFRPE-08 e BMIUFRPE-09), que não apresenta macrófitas

submersas, e duas cepas foram isoladas do reservatório de Cajueiro, localizado em Garanhuns-PE (BMIUFRPE-06 e BMIUFRPE-07), que possui extensos bancos das macrófitas submersas *Egeria densa* Planch., *Chara* spp. e *C. demersum*. Outros estudos (p.e. VAN DONK; VAN DE BUND, 2002; VANDERSTUKKEN et al., 2011; DONG et al., 2014) mostraram que estas macrófitas têm potencial de inibir *M. aeruginosa*. Ambos os reservatórios são eutróficos (dados não publicados) e possuem condições climáticas semelhantes (clima As segundo Köppen).

As cepas foram isoladas através da técnica de micropipetagem em outubro de 2017 e janeiro de 2018, e mantidas sob aclimação em condições laboratoriais no Banco de Microalgas da Universidade Federal Rural de Pernambuco – BMIUFRPE, no Laboratório de Ficologia – Taxonomia e Ecologia de Microalgas. Os cultivos das cianobactérias isoladas, foram mantidos em erlenmeyrs contendo meio nutritivo ASM1 (GORHAM et al., 1964), em câmara climática com condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1,5$), intensidade luminosa ($30 \mu\text{mol. Photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), pH (7,5), fotoperíodo (12 h) e homogeneizados três vezes ao dia. Os cultivos foram mantidos até a obtenção de uma biomassa de aproximadamente 50 mg.L^{-1} .

2.2. Obtenção e cultivo da macrófita *Ceratophyllum demersum*

Trinta dias antes da realização dos experimentos, ramos jovens e apicais de *C. demersum* foram coletados no reservatório de Carpina. As plantas foram coletadas em sacos plásticos escuros e encaminhadas ao Laboratório de Ficologia – Taxonomia e Ecologia de Microalgas da UFRPE. Após a coleta, as plantas foram lavadas várias vezes, com o auxílio de uma escova de cerdas macias juntamente aos jatos de água destilada para a remoção do sedimento, microalgas epífitas e zooplâncton/zoobentos que eventualmente estivessem aderidos aos ramos. Os cultivos foram realizados em aquários com dimensões de 20 cm^3 e capacidade para 8 L, contendo água da torneira em descanso por cinco dias para remoção do

cloro. As plantas foram cultivadas livres na água, sob condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), luminosidade ($30 \mu\text{mol. photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ com lâmpadas fluorescentes de 40 watts), aeração constante e fotoperíodo de 12 horas.

2.3. *Delineamento experimental*

Os experimentos foram conduzidos em uma sala climatizada asséptica com as mesmas condições descritas anteriormente para o cultivo das cepas. Foram usados erlenmeyers com capacidade para 1000 mL contendo 500 mL de meio cultivo ASM1 inoculado com culturas das cianobactérias em fase de crescimento exponencial. Para todas as cepas de *Microcystis* foram utilizadas a mesma biomassa (50 mg L^{-1}).

Foram determinados dois tratamentos (controle e coexistência) para cada cepa, totalizando oito. O tratamento controle consistiu no cultivo das cepas na ausência da planta, enquanto que no tratamento de coexistência foi adicionado um ramo da macrófita (7 g. L^{-1}) aos cultivos das cepas de cianobactérias. Todos os tratamentos foram realizados com quatro réplicas durante seis dias. Desta forma foi possível analisar os efeitos da coexistência de *C. demersum* sobre as cianobactérias nos dias 0, 2, 4 e 6. Três dias antes de se iniciar os experimentos, as plantas foram novamente lavadas várias vezes com água ultrapura, para remoção de algas e animais aderidos. Após este processo, as plantas foram transferidas para erlenmeyers que continham o meio de cultivo ASM1 para aclimação.

2.4. *Crescimento da macrófita aquática*

Com o objetivo de avaliar o crescimento de *C. demersum* nos tratamentos em que fora submetido à coexistência com as cepas de cianobactérias, os ramos foram pesados em uma balança de precisão, nos dias 0 e 6 do experimento, ambos foram avaliados com base no peso úmido da macrófita.

2.5. *Taxas de Crescimento e Inibição*

O cálculo das taxas de crescimento (μ) das cepas de cianobactérias submetidas à coexistência com *C. demersum* foi obtido com base nos valores de biomassa entre os dias de amostragem e a biomassa inicial dos experimentos. Foi utilizada a fórmula proposta por Wood et al. (2005): $\mu \text{ (d}^{-1}\text{)} = (\ln(N_t) - \ln(N_{t0})) / t - t_0$, onde N representa os valores de biomassa nos diferentes dias de experimento (t) e no tempo inicial (t₀). A taxa de inibição (TI%) foi expressa em porcentagem e avaliada através das diferenças entre os tratamentos e o controle das cianobactérias, sendo calculada como segue: $TI\% = ((N_{tr} - N_{ct}) / N_{ct}) \times 100\%$; onde N_{tr} e N_{ct} representam a densidade nos tratamentos de coexistência e nos controles, respectivamente. Os valores foram multiplicados por -1, desse modo, a taxa de inibição com valores positivos representa estímulo, e negativos a inibição das cepas.

2.6. Análises estatísticas

Para verificar diferenças entre os tratamentos para cada cepa, durante os dias de amostragem, foi utilizado o teste T de student para dados normais e o teste de Mann-Whitney para dados não normais. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma *one-way* ANOVA foi realizada para comparar os valores das taxas de crescimento e inibição em cada dia do experimento, desta forma foi possível observar diferenças entre os tratamentos e entre as cepas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R e o nível de significância foi ajustado em $p < 0,05$ (R CORE TEAM, 2016).

3. Resultados

3.1. Efeitos de *C. demersum* sobre a biomassa das cepas de *Microcystis*

A macrófita aquática *C. demersum* afetou o crescimento das cepas de *Microcystis* de forma diferenciada, em relação ao local de origem das cepas. Foram verificadas diferentes respostas entre as cepas isoladas de ambientes com a presença de macrófitas (Cajueiro) e as cepas isoladas de ambientes com a ausência de macrófitas (Tapacurá).

Diferenças significativas foram verificadas entre os tratamentos controle e de coexistência nas cepas isoladas do reservatório de Tapacurá (BMIUFRPE-08 e BMIUFRPE-09), as quais apresentaram inibição do crescimento a partir do quarto dia de experimento nos tratamentos de coexistência, e atingiram biomassas inferiores em relação ao início do experimento no sexto dia (Figura 1).

Em contrapartida, as cepas isoladas do reservatório de Cajueiro apresentaram retardo nos tratamentos de coexistência em relação ao controle. A cepa BMIUFRPE-06 apresentou retardo em sua biomassa a partir do quarto dia no tratamento de coexistência com a macrófita até o final do experimento, enquanto que, a cepa BMIUFRPE-07 não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos no último dia do experimento. Desta forma, as cepas provenientes do reservatório de Cajueiro foram pouco afetadas, assim comprovaram a hipótese de que as linhagens de *Microcystis* isoladas de ambientes com abundância de macrófitas submersas podem se tornar resistentes aos aleloquímicos.

3.2. Efeitos de *C. demersum* sobre as taxas de crescimento e inibições das cepas de *Microcystis*

Os tratamentos com as cepas de cianobactérias apresentaram taxas de crescimento semelhantes, todas positivas, no entanto, a cepa BMIUFRPE-06 diferenciou-se em comparação com as outras cepas, exceto para BMIUFRPE-07. No que se refere aos tratamentos de coexistência, foram observadas diferenças entre o crescimento das cepas isoladas do reservatório de Cajueiro: BMIUFRPE-06 ($0,10 \text{ d}^{-1}$) e BMIUFRPE-07 ($0,30 \text{ d}^{-1}$), contudo, ambas apresentaram valores de crescimento positivo, ou seja, um retardo no crescimento, o que sugere certa resistência aos aleloquímicos de *C. demersum* (Figura 2).

Por outro lado, as cepas isoladas do reservatório de Tapacurá não apresentaram diferenças com relação aos níveis de significância estatísticos, a cepa BMIUFRPE-08 apresentou valores negativos ($-0,04 \text{ d}^{-1}$), enquanto que BMIUFRPE-09 apresentou baixos

valores de crescimento positivo ($0,01 \text{ d}^{-1}$), os dados demonstram uma intensa sensibilidade aos aleloquímicos da macrófita, no entanto esta última cepa não diferiu estatisticamente da cepa BMIUFRPE-06 (Figura 2).

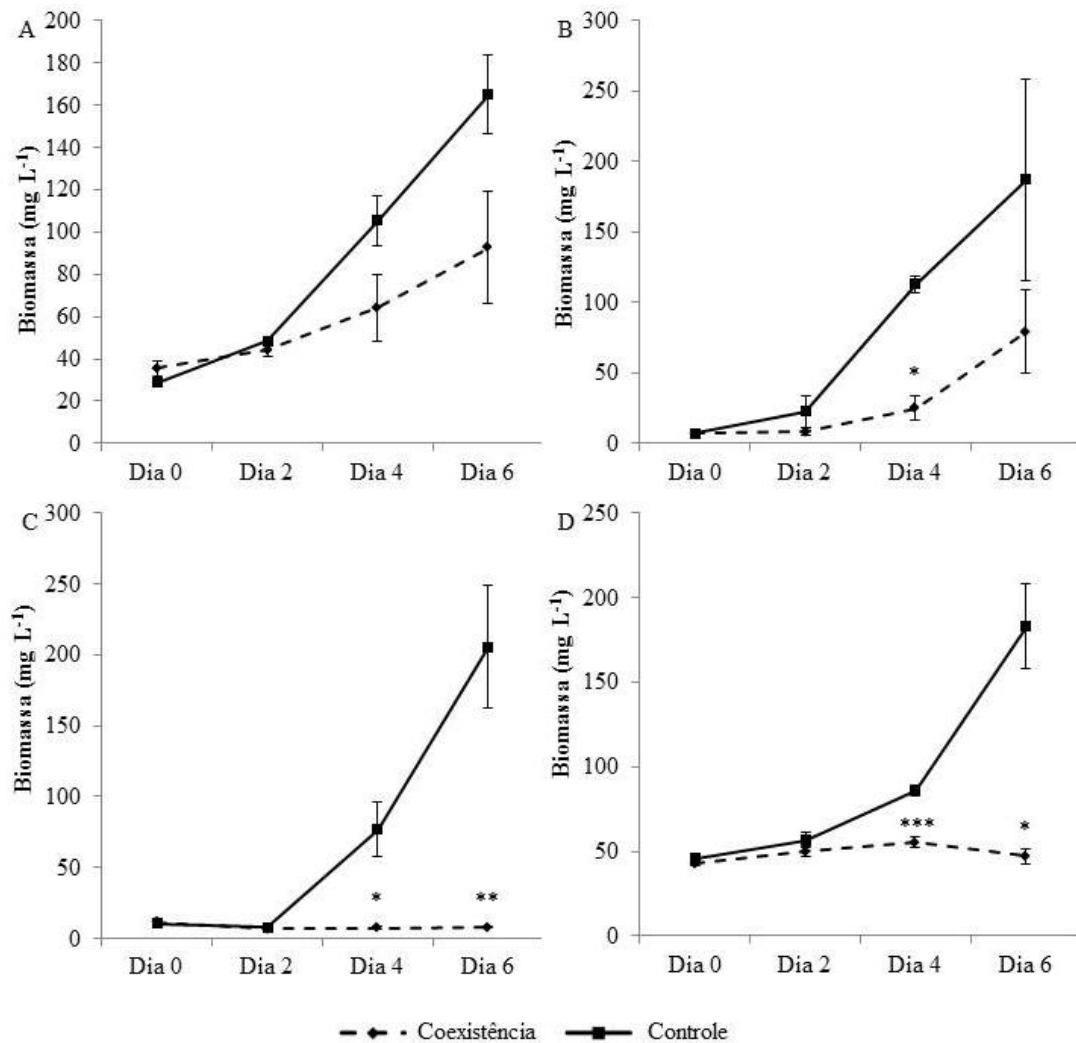


Figura 1. Efeitos alelopáticos da macrófita aquática *C. demersum* sobre a biomassa de cepas de *M. aeruginosa* isoladas de ambientes com *C. demersum* (A e B), e cepas de *M. panniformis* isoladas de ambientes com ausência de *C. demersum* (C e D). Diferenças significativas entre os tratamentos de coexistência e controle para cada dia são representadas por asteriscos (teste T, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Não foram verificadas diferenças entre o tratamento controle e o tratamento de coexistência para as cepas isoladas do ambiente com a presença da macrófita aquática (Cajueiro), em contrapartida, foram observadas diferenças nas cepas do reservatório com a ausência de macrófitas aquáticas (Tapacurá), em relação ao controle e a coexistência, a cepa BMIUFRPE-08 mostrou maior inibição, uma vez que foram verificados valores negativos, seguido pela BMIUFRPE-09 que apresentou baixos valores positivos, desta forma foi possível identificar a inibição que ocorreu nestas cepas (Figura 2).

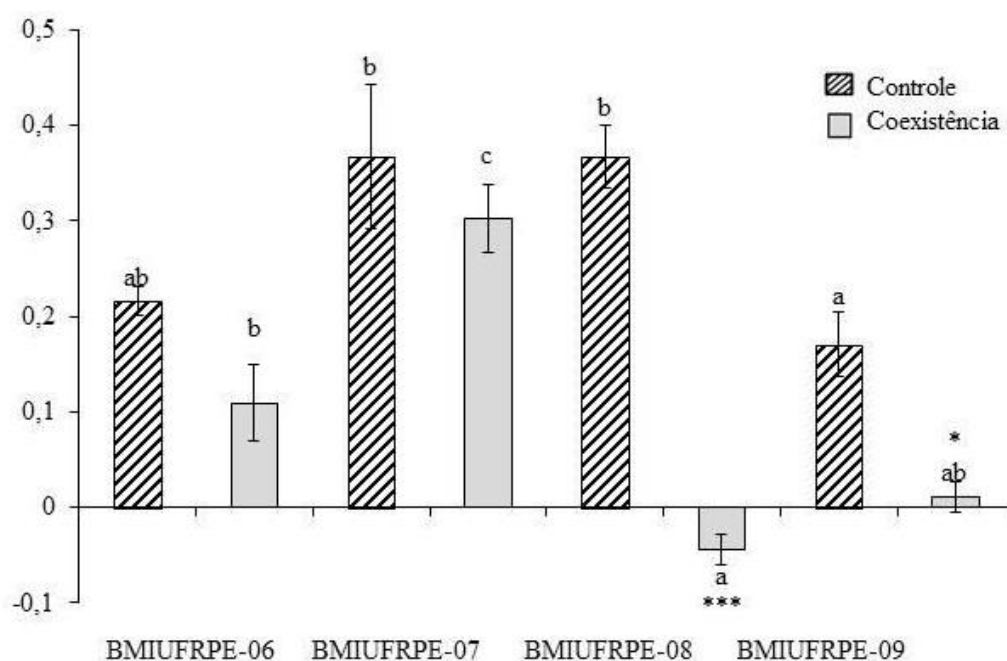


Figura 2. Taxas de crescimento das cepas de *Microcystis*. Asteriscos indicam diferenças para cada cepa em relação ao tratamento controle e coexistência (two-way ANOVA, *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$), enquanto que as letras minúsculas representam diferenças nos tratamentos entre as cepas.

As taxas de inibições expressaram melhor os valores para cada cepa nos tratamentos de coexistência com *C. demersum* (figura 3). Foi verificado que as cepas com maiores taxas de inibições foram as isoladas do reservatório de Tapacurá, a BMIUFRPE-08 apresentou

maior inibição (96,26 %), enquanto que, na BMIUFRPE-09 a biomassa inibida foi 74,31%, por outro lado, as cepas isoladas do reservatório de Cajueiro apresentaram menores valores, as quais indicaram o controle no crescimento destas cepas, isto é, BMIUFRPE-07 com um percentual de 57,63% de inibição da sua biomassa, seguida da BMIUFRPE-06 que foi inibida em 43,85% (Figura 3).

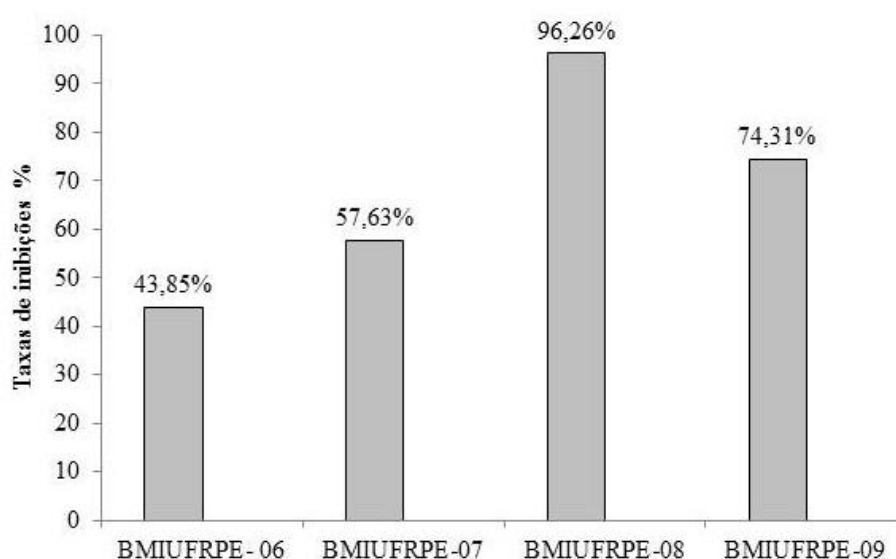


Figura 3. Taxas de inibições das cepas de *Microcystis*.

3.3. Crescimento de *C. demersum* após coexistência com cepas de *Microcystis*.

Com base nos valores do peso úmido dos ramos apicais da macrófita aquática no dia inicial e final do experimento, foi possível verificar que *C. demersum* aumentou o peso durante os dias de experimento (Figura 4). Os ramos apresentaram maiores valores de peso em coexistência com a cepa BMIUFRPE-08, seguida por BMIUFRPE-06. Os menores valores foram observados nos tratamentos com as cepas, BMIUFRPE-07 e BMIUFRPE-09.

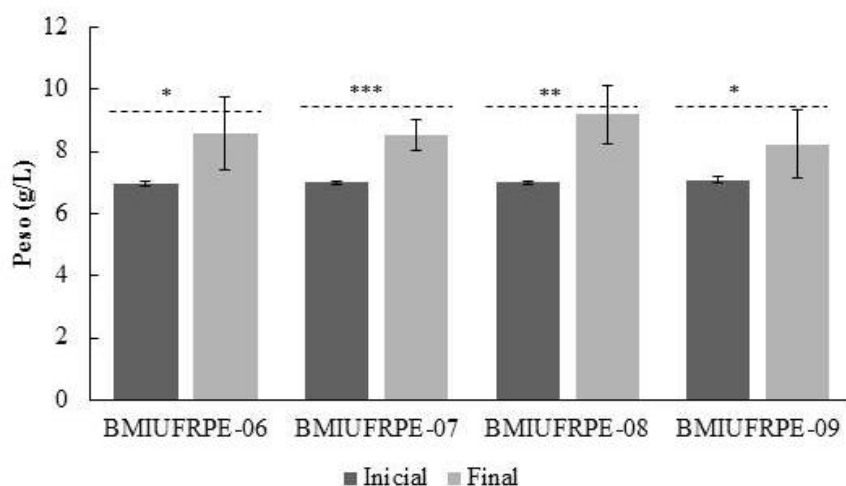


Figura 4. Peso (g/L) inicial e final dos ramos de *C. demersum* submetidos a coexistência com as cepas de *Microcystis*. Diferenças significativas entre os dias são representadas por asteriscos (teste T, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

4. Discussão

Nos últimos anos, o aumento da temperatura do planeta e dos níveis de eutrofização do recursos hídricos proporcionou o incremento das florações de cianobactérias (FALCONER, 2005, PAERL; OTTEN, 2013). Em especial, do gênero *Microcystis* que foi relatado em 108 países, isto é, todos os continentes, exceto na Antártica, desses países 79 apresentaram a produção de toxinas (HARKE et al., 2016).

Com isso, estudos de biomanipulação com a utilização de macrófitas aquáticas submersas, tornaram-se frequentes (DONG et al., 2014, MOHAMED, 2017,) e apresentaram bons resultados de redução, no entanto, é preciso considerar a exposição prévia de cianobactérias à essas plantas em seu ambiente natural.

A presença de macrófitas submersas pode ser um fator preponderante sobre a sensibilidade de *Microcystis*, o que torna este o primeiro trabalho a testar a influência desse fator. Outros estudos foram desenvolvidos com algas verdes, que são conhecidas por serem

menos sensíveis aos aleloquímicos (Zhu et al., 2010), onde Al-Shehri (2010) mostrou que uma cepa de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, proveniente de um lago com extensos bancos de *Stratiotes aloides* L. foi tolerante aos aleloquímicos da macrófita, enquanto que, uma cepa isolada de um lago sem *S. aloides* foi afetada pela macrófita, desta forma proporcionou a redução no crescimento e estresse oxidativo.

Desta maneira, espécies submetidas aos aleloquímicos a longo prazo, podem coevoluir com os seus hospedeiros, quando esses se estabilizam no novo ecossistema onde foram inseridas (REIGOSA; SANCHEZ-MOREIRAS; GONZALEZ, 1999). No entanto, está hipótese não foi confirmada por EIGEMANN; VANORMELIGEN; HILT, 2013 para *Pediastrum duplex*, já que as cepas isoladas de ambientes com ausência ou presença de *Myriophyllum spicatum*, não exibiram diferenças na sensibilidade aos aleloquímicos da planta, mesmo dispondo de uma ampla variabilidade genética.

Neste estudo, foi possível avaliar a sensibilidade de cepas de cianobactérias isoladas de locais diferentes. Foi observado que as cepas de *Microcystis aeruginosa* isoladas de ambientes com a presença de macrófitas submersas, incluindo *C. demersum*, foram menos afetadas pelos aleloquímicos desta planta quando cultivadas em coexistência. Em contrapartida, as cepas de *Microcystis panniformis* isoladas de ambientes com ausência da macrófitas mostraram ser mais sensíveis aos aleloquímicos, e foram inibidas ao final do experimento.

O complexo *Microcystis* (isto inclui as morfoespecies *M. panniformis* e *M. aeruginosa*) dispõe de uma ampla variabilidade genética (NGUYEN et al. 2012), por exemplo cepas produtoras e não produtoras de toxinas, no qual torna-se o principal fator influente sobre a sensibilidade destes organismos, quando submetidos as diversas pressões ambientais, dentre elas os aleloquímicos de macrófitas aquáticas submersas. Em contraste com

Pediastrum duplex, em que por sua vez a ampla variabilidade não interfere na sensibilidade (EIGEMANN; VANORMELIGEN; HILT, 2013).

Alguns estudos mostraram que *C. demersum* possui a capacidade de inibir cianobactérias, em especial *M. aeruginosa*, nos experimentos *in situ*, contudo, estes estudos são pouco relatados (DONG et al. 2014), e em laboratório por meio de experimentos de coexistência (NAKAI et al. 1999; KORNER et al. 2002).

Como verificado por Amorim et al. 2019, *C. demersum* inibe as cepas de *M. aeruginosa*, e *M. panniformis*, sendo mais acentuada em linhagens tóxicas do que em linhagens não produtoras de toxinas. No entanto, o presente trabalho aponta que a macrófita inibiu, de forma distinta, as cepas de cianobactérias, em consideração a sua origem, desta forma as cepas de *M. aeruginosa* – isoladas de ambientes com a presença de macrófitas submersas- foram inibidas com um crescimento controlado, em contraste com *M. panniformis* – isoladas de ambientes ausentes de *C. demersum* - a qual foi inibida a partir do quarto dia de coexistência e apresentou valores negativos de taxas de crescimento. Desse modo, é necessário considerar a origem das cepas, assim como, a produção de toxinas para a elaboração de medidas de mitigação.

Em relação à macrófita aquática, foi possível observar que *C. demersum* apresentou indícios de desenvolvimento uma vez que foi verificado aumento no peso, assim foi possível verificar que *C. demersum* pode ser eficiente para a biomanipulação de cianobactérias do gênero *Microcystis*. Não foi possível verificar nenhum efeito negativo das cepas sobre os ramos da planta em relação a sua morfologia, isto pode ser pelo fato destas cepas não produzirem toxinas, pois quando ocorre a produção, por exemplo de microcystina-LR, a macrófita pode vir a diminuir de tamanho, apresentar uma coloração amarelada em detrimento a descoloração pigmentar e até mesmo a perda de folhas, como observado por Pflugmacher (2002).

Por fim, concluímos que a macrófita submersa *C. demersum* foi capaz de se desenvolver em coexistência com as cepas de *Microcystis*, em contrapartida as cepas foram inibidas de formas diferenciadas, isto é, as cepas isoladas do ambiente livre de macrófitas foram inibidas, enquanto que as cepas isoladas de ambientes com plantas submersas foram menos sensíveis e apresentaram retardo no crescimento. Portanto, a hipótese de que cepas de *Microcystis* isoladas de reservatórios com intensos bancos de macrófitas submersas são mais resistentes aos aleloquímicos de *C. demersum*, enquanto que as cepas de ambientes sem macrófitas são mais sensíveis quando cultivadas em coexistência com a planta, foi confirmada, desta maneira foi possível demonstrar as diferentes sensibilidades de *Microcystis* em relação a origem das cepas e a presença de vegetação submersa nos locais de coleta.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa para a última autora (Proc. 304237/2015-9).

Referencias bibliográficas

- AL-SHEHRI, A.M. Differential sensitivities of different *Scenedesmus obliquus* strains to the allelopathic activity of the macrophytes *Stratiotes aloides*. *Journal of Applied Sciences*, 2010, 10(16), 1769-1774. <https://dx.doi.org/10.3923/jas.2010.1769.1774>
- AMORIM, C. A., MOURA-FALCÃO, R. H., VALENÇA, C. R., SOUZA, V. R. D. and MOURA, A. N.. Allelopathic effects of the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. on phytoplankton species: contrasting effects between cyanobacteria and chlorophytes. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 2019, 31(21), 1-10. <http://dx.doi.org/10.1590/s2179-975x1419>.
- AMORIM, C. A., ULISSES, C. and MOURA, A. N. Biometric and physiological responses of *Egeria densa* Planch. cultivated with toxic and non-toxic strains of *Microcystis*. *Aquatic Toxicology*, 2017, 191, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.012>
- BEHRA, R., GENONI, G. P. and JOSEPH, A. L. Effect of atrazine on growth, photosynthesis, and between-strain variability in *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae).

Archives of environmental contamination and toxicology, 1999, 37(1), 36-41.
<https://doi.org/10.1007/s002449900487>

BERGER, P. et al. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: Chapter 9: Causes, Prevention, and Mitigation Workgroup Report. 2008.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., SANTOS, D. M. S. and MOURA, A. N. Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using a molecular method. *Brazilian Journal of Biology*, 2010, 70(4), 1005–1010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000500012>

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., PICCIN-SANTOS, V., MOURA, A. N. and ARAGÃO-TAVARES, N. K. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2014, 86(1), 297-310. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201302512>.

BOARU, D. A., DRAGOS, N. and SCHIRMER, K. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. *Toxicology*, 2006, 218(2), 134-148. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.005>

CALLAWAY, R.M. and ASCHEHOUG, E.T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science*, 2000, 290(5491), 521-523. <https://doi.org/10.1126/science.290.5491.521>

CALLAWAY, R.M. and RIDENOUR, W.M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2004, 2(8), 436-443. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0436:NWISAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0436:NWISAT]2.0.CO;2)

CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S. M., AN, J. S., MOLICA, R. J., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K. L., SHAW, G. R. and EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(7), 663-668. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.01109663>

CHANG, X., EIGEMANN, F. and HILT, S. Do macrophytes support harmful cyanobacteria? Interactions with a green alga reverse the inhibiting effects of macrophyte allelochemicals on *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, 2012, 19, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.06.002>

CHELLAPPA, N. T., CHELLAPPA, S. L. and CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Brazilian archives of Biology and technology*, 2008, 51(4), 633-641. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000400022>

DAVIS, R. and KOOP, K. Eutrophication in Australian rivers, reservoirs and estuaries – a southern hemisphere perspective on the science and its implications. *Hydrobiologia*, 2006, 559, 23–76. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-4429-2>

DAVIS, T.W., BERRY, D.L., BOYER, G.L. and GOBLER, C.J. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful algae*, 2009, 8(5), 715-725. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>

DOLMAN, A. M., RÜCKER, J., PICK, F. R., FASTNER, J., ROHRLACK, T., MISCHKE, U. and WIEDNER, C. Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PloS one*, 2012, 7(6), 38757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>

DONG, J., YANG, K., LI, S., LI, G. and SONG, L. Submerged vegetation removal promotes shift of dominant phytoplankton functional groups in a eutrophic lake. *Journal of environmental Sciences*, 2014, 26(8), 1699-1707. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.010>

EIGEMANN, F., HILT, S. and SCHMITT-JANSEN, M. Flow cytometry as a diagnostic tool for the effects of polyphenolic allelochemicals on phytoplankton. *Aquatic Botany*, 2013, 104, 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.10.005>

EIGEMANN, F., VANORMELINGEN, P. and HILT, S. Sensitivity of the green alga *Pediastrum duplex* Meyen to allelochemicals is strain-specific and not related to co-occurrence with allelopathic macrophytes. *PloS one*, 2013, 8(10), 78463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078463>

FALCONER, I. R. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply?. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 2005, 33(1), 64-71. <https://doi.org/10.1002/aheh.200300551>

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T. and KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 1964, 15, 796-804. <https://doi.org/10.1080/03680770.1962.11895606>

GROSS, E. Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. In. INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Eds.). Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions. Boca Raton: CRC press, 1999, pp. 179-199.

GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2003, 22(3-4), 313-339. <https://doi.org/10.1080/713610859>

HARKE, M. J., STEFFEN, M. M., GOBLER, C. J., OTTEN, T. G., WILHELM, S. W., WOOD, S. A. and PAERL, H. W. A review of the global ecology, genomics, and

biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*, 2016, 54, 4– 206. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>.

HILT, S. Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. *Aquatic Botany*, 2006, 85(3), 252-256. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.05.004>

HILT, S., GHOBRIAL, M.G.N. and GROSS, E.M. In situ allelopathic potential of *Myriophyllum verticillatum* (Haloragaceae) against selected phytoplankton species. *Journal of Phycology*, 2006, 42(6), 1189-1198. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00286.x>

HILT, S. and GROSS, E.M. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilize clear water states in shallow eutrophic lakes? *Basic and Applied Ecology*, 2008, 9(4), 422– 432. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2007.04.003>.

HUTCHINSON, G. E. A Treatise of Limnology. *Limnological botany*, 1975, 3.

JEPPESEN, E., JENSEN, J.P., SØNDERGAARD, M., LAURIDSEN, T., PEDERSEN, L.J. and JENSEN, L. Top-down control in freshwater lakes: the role of nutrient state, submerged macrophytes and water depth. *Hydrobiologia*, 1997, 342, 151–164. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5648-6_17

KARDINÄAL, W.E.A., TONK, L., JANSE, I., HOL, S., SLOT, P., HUISMAN, J. and VISSER, P.M. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9), 2939-2946. <https://doi.org/10.1128/AEM.02892-06>

KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2-Chroococcales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 1986, 73(2), 157-226.

KORNER, S. and NICKLISCH, A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology*, 2002, 38(5), 862-871. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-02001.x>.

LIANG, Y., OUYANG, K., CHEN, X., SU, Y. and YANG, J. Life strategy and grazing intensity responses of *Brachionus calyciflorus* fed on different concentrations of microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *Scientific Reports*, 2017, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43127>

MOHAMED, Z. A. Macrophytes-Cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management— a review. *Limnologia-Ecology and Management of Inland Waters*, 2017, 63, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.006>

MOURA, A. N., ARAGÃO-TAVARES, N. K.C. and AMORIM, C. A. Cyanobacterial blooms in freshwaters bodies in a semiarid region, northeastern Brazil: A review. *Journal of Limnology*, 2018. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1646>.

NAKAI, S., INOUE, Y., HOSOMI, M. and MURAKAMI, A. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Science and Technology*, 1999, 39(8), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00185-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00185-7).

NGUYEN, A. L. V., TANABE, Y., MATSUURA, H., KAYA, K. and WATANABE, M. M. Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycological research*, 2012, 60(3), 208-222. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00650.x>

PAERL, H.W. and OTTEN, T.G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 2013, 65(4), 995-1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.

PANOSSO, R., COSTA, I. A. S., SOUZA, N. R., ATTAYDE, J. L., CUNHA, S. R. S. and GOMES, F. C. F. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle de florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecologia brasiliensis*, 2007, 11(3), 433-449.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology*, 2002, 17(4), 407-413. <https://doi.org/10.1002/tox.10071>.

PICCIN-SANTOS, V. and BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Toxic cyanobacteria in four Brazilian water supply reservoirs. *J. Environ. Prot.* 2012, 3, 68-73. <http://dx.doi.org/10.4236/jep.2012.31009>

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. <https://www.R-project.org/>

REIGOSA, M. J., SANCHEZ-MOREIRAS, A. and GONZALEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy, *Crit. Rev. Plant Sci.* 1999, 18, 577-608. <https://doi.org/10.1080/07352689991309405>

RICE, E. L. Allelopathy. *Academic Press*, Orlando, Florida, 1984.

SCHEFFER, M. Multiplicity of stable states in freshwater systems. *Hydrobiologia*, 1990, 200/201, 475-486. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0924-8_42

SCHEFFER, M., HOSPER, S. H., MEIJER, M. L., MOSS, B. and JEPPESEN E. Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology and Evolution*, 1993, 8, 275-279. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90254-M](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90254-M).

- SCHEFFER, M., CARPENTER, S., FOLEY, J. A., FOLKE, C. and WALKER, B. Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, 2001, 413(6856), 591. <https://doi.org/10.1038/35098000>
- ŠVANYS, A., EIGEMANN, F., GROSSART, H. P. and HILT, S. Microcystins do not necessarily lower the sensitivity of *Microcystis aeruginosa* to tannic acid. *FEMS microbiology letters*, 2016, 363(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv227>.
- ŠVANYS, A., PAŠKAUSKAS, R. and HILT, S. Effects of the allelopathically-active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community –a mesocosm study. *Hydrobiologia*. 2014, 737, 57–66. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1782-4>
- SVIRČEV, Z., DROBAC, D., TOKODI, N., MIJOVIĆ, B., CODD, G.A. and MERILUOTO, J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017, 91, 621–650. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
- VANDERSTUKKEN, M., MAZZEO, N., VAN COLEN, W., DECLERCK, S. A. J. and MUYLAERT, K. Biological control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes *Egeria densa* and *Potamogeton illinoensis*: a mesocosm study. *Freshwater Biol.* 2011, 56, 1837–1849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02624.x>
- VAN DONK, E. and VAN DE BUND, W. J. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany*, 2002, 72, 261–274. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00205-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00205-4)
- VANORMELINGEN, P., VYVERMAN, W., DE BOCK, D., VAN DER GUCHT, K. and DE MEESTER, L. Local genetic adaptation to grazing pressure of the green alga *Desmodesmus armatus* in a strongly connected pond system. *Limnology and Oceanography*, 2009, 54, 503–511. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.2.0503>
- WHITTAKER, R.H. and FEENY, P.P. Allelochemicals: chemical reactions between species. *Science*, 1971, 171, 757–770.
- ZHU, J., LIU, B., WANG, J., GAO, Y. and WU, Z. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. *Aquatic toxicology*, 2010, 98(2), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.011>

Form and preparation of manuscripts

Manuscripts submitted to *Acta Limnologica Brasiliensia* should be original and not being

considered for publication elsewhere. Submission should be done in a single file by SciELO Publication System in the journal link: <http://submission.scielo.br/index.php/alb/index>. Manuscripts should be submitted in English, and an abstract in Portuguese must also be included. We strongly recommend that authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscript checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Text

The following order must be used. First page: title in English (in bold type) and Portuguese, authors' full name (e.g., Antonio Fernando Monteiro Camargo), affiliation, address and email address of all authors. All the authors should be identified by a superscript number. Second page: Abstract (in English and Portuguese) and keywords. Third and following pages: text of the article (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, and References). The following information should accompany all species cited in the text: a) for zoology, author name and the publication date of the original description should be given the first time that species is cited in the article; and b) for botany, only the name of the author who made the description should be given the first time that species is cited in the article.

Abstract

The concise abstract (250-300 words) should be structured into the following topics: aim, methods, major results, and conclusions. The topics should be highlighted in bold. Four to five keywords should be supplied and should be distinct from those used in the title.

Tables

and

Figures

Tables and figures should be numbered consecutively using Arabic numerals (Table 1, 2, 3 etc. and Figure 1, 2, 3, etc.). In the first version, the tables and figures should be inserted in the text as they are cited. In the final version, the tables and figures should be inserted after the references. Figures should be in high resolution (300 DPI or more). Photographs and figures in color can be used in the electronic version. Tables and figures must be mentioned in the text.

Units,

Symbols

Use the International System Units (SI), separating the units from the value with a space, except in the case of percentages; use abbreviations whenever possible. For compost units, use exponentials and not forward slashes (e.g., mg.day⁻¹ instead of mg/day, Xmol.min⁻¹ instead of Xmol/min). Do not add spaces to shift to the next line if a unit does not fit on a line.

Supplemental Material

Inclusion of supplemental material is permitted in the electronic version.

References

Citation from dissertations, theses, undergraduate monographs, technical reports or abstracts for congresses should be avoided as much as possible and only in exceptional circumstances and with the referees and the Editor in Chief consent may be used. Citation in the text: Use the name and year system: Schwarzbald (2009); (Calijuri, 2009); (Santoro & Enrich-Prast, 2010); for more three authors use "et al.". Citations from the list of references should follow the ISO 690/2010 standard: All references cited in the text should be listed alphabetically in uppercase letters according to the first authors. References should start on a separate page.

Examples:

Journal:

The academic paper references must be presented in the correct established way: name of the author abbreviated (surname, given name), title of the work, journal title, date of publication, edition number, and page numbers without omission of any relevant information.

ESTEVEZ, K.E., LÔBO, A.V.P. and HILSDORF, A.W.S. Abiotic features of a river from the Upper Tietê River Basin (SP, Brazil) along an environmental gradient. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 2015, 27(2), 228-237.

Chapter or Section in Book:

THOMAZ, S.M. and ESTEVES, F.A. Comunidade de macrófitas aquáticas. In: ESTEVES, F.A., ed. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2011, pp. 461-518. 3 ed.

Book:

TUNDISI, J.G. and MATSUMURA-TUNDISI, T. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

Offprints

A complementary copy of the edition will be sent to the first author of the manuscript

Send of the manuscripts

The manuscripts prepared according to the aforementioned instructions need to be sent in *Word* for Windows by SciELO Publication System (<http://submission.scielo.br/index.php/alb/index>). Brazilian Association of Limnology does not charge any fee for submission and evaluation of manuscripts. Manuscripts submission by SciELO Publication System will be done from January 4, 2016. Submissions prior to this date must be made by e-mail actalimno@gmail.com. From January 4, 2016, all procedures for manuscripts evaluation (between author, editor and reviewers) submitted by SciELO Publishing System will be done via system.