



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO**

RANIELLE DAIANA DOS SANTOS SILVA

**INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CEPAS DE *Raphidiopsis raciborskii* E
Microcystis aeruginosa EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NITROGÊNIO,
FÓSFORO E MUDANÇAS DE TEMPERATURAS**

**CAMPINA GRANDE
2020**

RANIELLE DAIANA DOS SANTOS SILVA

INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CEPAS DE *Raphidiopsis raciborskii* E
Microcystis aeruginosa EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NITROGÊNIO,
FÓSFORO E MUDANÇAS DE TEMPERATURAS

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Área de concentração: Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Etham de Lucena Barbosa

Coorientador: Mathias Ahii Chia.

CAMPINA GRANDE
2020

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586i Silva, Ranielle Daiana dos Santos.
Interações alelopáticas entre cepas de *Raphidiopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* em diferentes condições de nitrogênio, fósforo e mudanças de temperaturas [manuscrito] / Ranielle Daiana dos Santos Silva. - 2020.

73 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2020.

"Orientação : Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."

1. Eutrofização. 2. Aquecimento global. 3. Alelopatia. 4. Cianobactérias. 5. Cianotoxinas. I. Título

21. ed. CDD 577

RANIELLE DAIANA DOS SANTOS SILVA

INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CEPAS DE *Raphidiopsis raciborskii* E
Microcystis aeruginosa EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NITROGÊNIO,
FÓSFORO E MUDANÇAS DE TEMPERATURAS

Trabalho de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Área de concentração: Ecologia e Conservação.

Aprovada em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Juliana dos Santos Severiano (membro interno)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Micheline Kézia Cordeiro de Araújo (membro externo)
Universidade de São Paulo (USP/ESALQ)

*Dedicatória José dos Santos Silva (in memoriam),
por todo amor, carinho, dedicação e estímulo
para sempre seguir com meus estudos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar ao meu lado em cada passo que dei até aqui, por me guiar nos meus piores momentos, por todo amor, sabedoria e sustento para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

Aos meu pais, José dos Santos Silva (in memoriam) e Maria Lindalva da Silva por todo amor e carinho, por segurar minha mão e acreditar em mim mesmo quando eu não fui capaz. Ao meu pai deixo este singelo trabalho em homenagem ao grande homem que me educou e sonhou com este dia, a minha mãe deixo a esperança de novos rumos e a felicidade de partilharmos este momento. Aos meus irmãos Welisson e Nayara por todo companheirismo e amor, e aos meus amados sobrinhos Wesley, Kaio e Henrique.

Ao meu esposo, Gilvan meu companheiro que por tantos momentos me incentivou a prosseguir, por todo carinho e parceria em tudo inclusive na etiquetagem do meu experimento rsrs.

Ao meu Orientador Dr. José Etham de Lucena Barbosa, por todos os ensinamentos, apoio, paciência e confiança. Por acreditar em meu trabalho e incentivar esta pesquisa. Por me aceitar como sua “filha de laboratório” desde minha graduação e contribuir grandemente com minha formação profissional.

Ao meu Co-orientador Dr. Mathias Ahii Chia por toda paciência, ensinamentos e dedicação com meu trabalho, bem como as orientações para manutenção do nosso cultivo de cianobactérias. Agradeço por ter aceitado a parceria e contribuir imensamente com meu aprendizado durante estes dois anos.

A Dr. Juliana dos Santos Severiano, a quem considero também como minha co-orientadora e tenho imenso carinho. Obrigada por todos e incansáveis ensinamentos, por acreditar em meu trabalho juntamente com o professor Etham. Por me acompanhar durante a fase de experimentação e incentivar inúmeras vezes, por segurar minhas mãos todas as vezes que cheguei sem força alguma no laboratório.

A Dayany minha grande amiga, que tem estado do meu lado desde da graduação. Obrigada por toda força, e momentos que passamos.

Ao pessoal do cultivo, Vanessa, Taty e Vitor, bem como a Dany, Raquel e Joana por terem ajudado intensamente na realização dos experimentos. A galerinha do laboratório (Camila, Morgana, Mateus, Gustavo, Klisman e Patrícia) que de uma forma ou de outra me ajudaram.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

A Universidade Estadual da Paraíba.

A Capes pela bolsa concedida.

Muito Obrigada!

Silva, Ranielle Daiana dos Santos; M.Sc.; Universidade Estadual da Paraíba, fevereiro de 2020; INTERAÇÕES ALELOPÁTICAS ENTRE CEPAS DE *Raphidiopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa* EM DIFERENTES FORMAS DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E CONDIÇÕES DE TEMPERATURAS; José Etham de Lucena Barbosa (Orientador), Mathias Ahii Chia (Co-Orientador).

RESUMO

Os efeitos combinados do aumento da eutrofização e das temperaturas globais nos ecossistemas aquáticos têm favorecido a expansão das florações e toxicidade das cianobactérias. As espécies *Raphidiopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* têm se destacado por sua dominância e expansão em corpos aquáticos de todo o mundo. Em ecossistemas tropicais, *Raphidiopsis raciborskii* tem co-dominado ou substituído *Microcystis aeruginosa*, em decorrência das condições nutricionais do ambiente ou de suas características ecofisiológicas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das mudanças de temperatura e condições nutricionais nas interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Foram realizados experimentos de cultura mista, meio livre de células e co-cultura em câmaras particionadas com cepas de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Os experimentos foram realizados com biovolume inicial de cada cepa de $4,0 \times 10^6 \mu\text{M}^3 \text{mL}^{-1}$ nas temperaturas 24 °C e 30 °C e meio ASM-1, condição controle, e meio ASM-1 modificado com concentrações elevadas de nitrato (7 mmol NaNO_3), ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 50 mM), e fosfato (350 μmol de Na_2PO_3). As culturas foram incubadas durante oito dias, amostras para medições do número de células, biomassa e conteúdo de cianotoxinas foram coletadas em dias alternados. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) de três fatores para verificar a influência da temperatura e dos nutrientes no biovolume, concentração de toxinas, taxas de crescimento e taxa de inibição das cepas. Altos níveis de nitrato e fosfato mostraram induzir o crescimento das cepas de cianobactérias, enquanto a uréia não mostrou ser ideal para o crescimento destes organismos. *Raphidiopsis raciborskii* apresentou maior crescimento do que *M. aeruginosa* em monocultura ou durante os experimentos de competição. O aumento da temperatura mostrou elevar o crescimento populacional de *R. raciborskii* e redução do volume celular desta espécie, verificamos que a temperatura intensificou as interações entre as espécies, promovendo maior vantagem competitiva a *R. raciborskii*. O aumento da temperatura levou o aumento da produção de microcistina e redução do conteúdo de saxitoxina em monocultura, por outro lado, durante a competição a temperatura elevada aumentou as concentrações de saxitoxinas. Os resultados encontrados neste estudo, sugerem que as toxinas podem ser consideradas como potenciais aleloquímicos capazes de exercer forte influência nas interações, e o aumento da temperatura e nutrientes (nitrato e fosfato) promoveram a dominância de *R. raciborskii* sobre *M. aeruginosa*.

Palavras-Chave: Eutrofização. Aquecimento global. Alelopatia. Cianobactérias. Cianotoxinas.

Silva, Ranielle Daiana dos Santos; M.Sc .; State University of Paraíba, February 2020; ALLELOPATHIC INTERACTIONS BETWEEN *Raphidiopsis raciborskii* AND *Microcystis aeruginosa* strains IN DIFFERENT FORMS OF NITROGEN, PHOSPHORUS AND TEMPERATURE CONDITIONS; José Etham de Lucena Barbosa (Advisor), Mathias Ahii Chia (Co-Advisor).

RESUME

The combined effects of increased eutrophication and global temperatures on aquatic ecosystems have favored the expansion of blooms and cyanobacterial toxicity. The species *Raphidiopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* have stood out for their dominance and expansion in aquatic bodies around the world. In tropical ecosystems, *Raphidiopsis raciborskii* has co-dominated or replaced *Microcystis aeruginosa*, due to the nutritional conditions of the environment or its ecophysiological characteristics. Given the above, this study aimed to evaluate the effects of changes in temperature and nutritional conditions on allelopathic interactions between *R. raciborskii* and *M. aeruginosa*. Mixed culture, cell-free media and co-culture experiments were carried out in partitioned chambers with strains of *R. raciborskii* and *M. aeruginosa*. The experiments were carried out with initial biovolume of each strain of $4.0 \times 10^6 \mu\text{M}^3 \text{ mL}^{-1}$ at temperatures 24 °C and 30 °C and ASM-1 medium, control condition, and modified ASM-1 medium with high concentrations of nitrate (7 mmol NaNO_3), urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 50 mM), and phosphate (350 μmol of Na_2PO_3). Cultures were incubated for eight days, samples for measurements of cell number, biomass and cyanotoxin content were collected on alternate days. Three-way analysis of variance (ANOVA) was performed to check the influence of temperature and nutrients on biovolume, concentration of toxins, growth rates and rate of inhibition of strains. High levels of nitrate and phosphate have been shown to induce the growth of strains of cyanobacteria, while urea has not been shown to be ideal for the growth of these organisms. *Raphidiopsis raciborskii* showed greater growth than *M. aeruginosa* in monoculture or during competition experiments. The increase in temperature showed an increase in the population growth of *R. raciborskii* and a reduction in the cell volume of this species, we verified that the temperature intensified the interactions between species, promoting greater competitive advantage to *R. raciborskii*. The increase in temperature led to an increase in the production of microcystin and a reduction in the content of saxitoxin in monoculture, on the other hand, during the competition the high temperature increased the concentrations of saxitoxins. The results found in this study suggest that toxins can be considered as potential allelochemicals capable of exerting a strong influence on interactions, and the increase in temperature and nutrients (nitrate and phosphate) promoted the dominance of *R. raciborskii* over *M. aeruginosa*.

Key words: Eutrophication. Global warming. Allelopathy. Cyanobacteria. Cyanotoxins.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** As diferentes combinações experimentais utilizadas nos experimentos de monocultura e meio livre de células. *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* representam linhagens tóxicas. *R. raciborskii* + MaCFM representa células de *Raphidiopsis* exposta ao meio livre de células de *Microcystis* e *M. aeruginosa* + CrCFM representa células de *Microcystis* expostas ao meio livre de células de *Raphidiopsis*. O controle é o meio de cultivo normal (ASM-1), em cada condição de temperatura há concentrações de nitrato, ureia e fósforo..... 31
- Tabela 2.** Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em cultura mista.....34
- Tabela 3.** Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em cultura mista.....34
- Tabela 4.** Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a meio livre de células de *R. raciborskii* sob diferentes condições de temperaturas e nutrientes.....41
- Tabela 5.** Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a meio livre de células de *M. aeruginosa* sob diferentes condições de temperaturas e nutrientes.....41
- Tabela 6.** Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em câmara compartilhada 37
- Tabela 7.** Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em câmara compartilhada 37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Delineamento experimental. Experimentos em meio livre de células, cultura mista e co-cultivo em câmaras particionadas.....32
- Figura 2.** Contribuição relativa do biovolume celular ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$) das culturas mistas nas condições de A= controle em 24°C, B= controle em 30°C, C= nitrato em 24°C, D= nitrato em 30°C, E= uréia 24°C, F= uréia 30°C, G=fosfato 24°C, H= fosfato 30°C.....35
- Figura 3.** Taxa de crescimento específico. A= *M. aeruginosa* em cultura mista com *R. raciborskii* em 24°C, B= *M. aeruginosa* em cultura mista com *R. raciborskii* em 30°C, C= *R. raciborskii* em cultura mista com *M. aeruginosa* em 24°C, D= *R. raciborskii* em cultura mista com *M. aeruginosa* em 30°C.....36
- Figura 4.** Taxa de inibição/estimulo de crescimento. *M. aeruginosa* em cultura mista 24° (A); *M. aeruginosa* em cultura mista 30° (B); *R. raciborskii* em cultura mista 24°C (C); *R. raciborskii* em cultura mista 30°C (D).....37
- Figura 5.** Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, e cultura mista de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. A= T1 (24°C), B= T2 (30°C). C= controle, N= nitrato, P= fosfato.....38
- Figura 6.** Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, e cultura mista de *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. A= T1 (24°C), B= T2 (30°C). C= controle, N= nitrato, P= fosfato.....49
- Figura 7.** Biovolume ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$) de A= monocultura de *M. aeruginosa* em 24°C, B= monocultura de *M. aeruginosa* em 30°C, C= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* em 24°C, D= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* em 30°C, E= monocultura de *C. raciborskii* em 24°C, F= monocultura de *C. raciborskii* em 30°C, G= *C. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 24°C, H= *C. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 30°C.*= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre Fosfato e Controle; ◆ = Diferença significativa de biovolume de *C. raciborskii* na presença de filtrado livre de células de *M. aeruginosa*;

◇ = Diferença significativa de biovolume de *M. aeruginosa* na presença de filtrado livre de células de *C. raciborskii*48

Figura 8. Volume celular ($\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$) de monocultura de *M. aeruginosa* = Mic, células de *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* = Mic+CrFM, monocultura de *C. raciborskii* = Cyl, células de *C. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* = Cyl+MaCFM. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.....43

Figura 9. Taxa de crescimento específico. A= monocultura de *M. aeruginosa* em 24°C, B= monocultura de *M. aeruginosa* em 30°C, C= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* em 24°C, D= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* em 30°C, E= monocultura de *R. raciborskii* em 24°C, F= monocultura de *R. raciborskii* em 30°C, G= *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 24°C, H= *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 30°C.....44

Figura 10. Taxa de inibição/estimulo de crescimento. *M. aeruginosa* + CrCFM em 24° (A); *M. aeruginosa* + CrCFM em 30° (B); *R. raciborskii* + MaCFM em 24°C (C); *R. raciborskii* + MaCFM em 30°C.....45

Figura 11. Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, e *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* (MaCFM). A= T1 (24°C), B= T2 (30°C). C= controle, N= nitrato, P= fosfato.....46

Figura 12. Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, e *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* (CrCFM). 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato.47

Figura 13. Mudanças no biovolume de *M. aeruginosa* durante co-cultivação com *R. raciborskii* em câmara particionada. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.*= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre

Fosfato e Controle; ◆ = Diferença significativa de biovolume de *M. aeruginosa* durante a co-cultivação com *R. raciborskii* em câmara particionada50

Figura 14. Mudanças no biovolume de *R. raciborskii* durante co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.*= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre Fosfato e Controle; ◆ = Diferença significativa de biovolume de *R. raciborskii* durante a co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada52

Figura 15. Alteração morfológica na cepa de *R. raciborskii* durante a co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada. A) Monocultura de *R. raciborskii* em 24°C; B) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular e presença de vesículas em co-cultivo na condição nitrato 24°C; C) *R. raciborskii* com divisão de células espaçadas na condição controle 24°C; D) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição fosfato 24°C; E) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição nitrato 30°C; F) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição fosfato 30°C 53

Figura 16. Taxa de crescimento específico de co-cultura em câmara compartilhada. A= *M. aeruginosa* em 24°C, B= *M. aeruginosa* em 30°C, C= *R. raciborskii* em 24°C, D= *R. raciborskii* em meio 30°C.....55

Figura 17. Taxa de inibição/estimulo de crescimento em co-cultivação em câmara particionada. *M. aeruginosa* em 24° (A); *M. aeruginosa* em 30° (B); *R. raciborskii* em 24°C (C); *R. raciborskii* 30°C..... 56

Figura 18. Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, durante co-cultivação de *R. raciborskii* em câmara particionada com *M. aeruginosa*. 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato. 57

Figura 19. Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, durante co-cultivação de *M. aeruginosa* em câmara particionada com *R. raciborskii*. 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

ITEPA1- *Raphidiopsis raciborskii*

CrCFM- *Raphidiopsis raciborskii* em meio livre de células de *Microcystis aeruginosa*

MaCFM- *Microcystis aeruginosa* em meio livre de células de *Raphidiopsis raciborskii*

ANOVA- Análise de variância

GLM- Modelo linear generalizado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	HIPÓTESES.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo geral.....	17
3.2	Objetivos específicos.....	17
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
	ARTIGO I.....	23
	RESUMO.....	24
1	INTRODUÇÃO.....	25
2	MATERIAIS MÉTODOS.....	27
2.1	Cepas das cianobactérias.....	27
2.2	Delineamento experimental.....	27
2.3	Experimento de cultura mista.....	28
2.4	Experimento com meio livre de células.....	28
2.5	Experimento de co-cultivo em câmaras particionadas.....	29
2.6	Coleção de dados.....	32
2.7	Análise estatística.....	32
3	RESULTADOS.....	33
3.1	<i>Experimentos de Cultura mista de R. raciborskii e M. Aeruginosa.....</i>	33
3.2	<i>Experimento com meio de células de R. raciborskii e M. Aeruginosa.....</i>	39
3.3	<i>Co-cultivo de R. raciborskii e M. aeruginosa usando câmara compartilhada.....</i>	48
4	DISCUSSÃO.....	58
4.1	Biovolume e efeitos alelopáticos das cianobactérias.....	59
4.2	Produção de toxina.....	62
5	CONCLUSÕES.....	65
6	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

Efeitos das mudanças climáticas como alterações nos padrões de precipitação e a elevação da temperatura global associados ao aumento das poluições antropogênicas de nutrientes, causam frequentes florações de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos em todo o mundo (RECKNAGEL et al., 2017; YANG et al., 2016). O efeito combinado desses estressores ambientais atuam no metabolismo, taxa de crescimento, intensidade e toxicidade das florações das cianobactérias (PAERL e HUISMAN, 2009; PAERL et al., 2016; DESCY et al., 2016; GLOBER et al., 2016). O enriquecimento de nutrientes em corpos aquáticos, especialmente nitrogênio e fósforo mudaram substancialmente ao longo das últimas décadas em consequências do desenvolvimento urbano, agrícola e industrial, alterando negativamente a estrutura e função dos ecossistemas aquáticos, contribuindo substancialmente para o aumento das florações de cianobactérias tóxicas (PAERL e PAUL, 2012; CAO et al., 2016).

Diversos estudos relatam a influência da temperatura na dominância das cianobactérias em corpos aquáticos (BRIAND; LÉBOULANGER; HUMBERT, 2004; LÜRLING et al., 2013; MANTZOUKI et al., 2016; WALLS et al., 2018). Espera-se, que além do aumento da temperatura global, as mudanças climáticas sejam acompanhadas pela frequência de eventos hidrológicos extremos como tempestades, inundações e secas mais severas (IPCC, 2012; HAVENS et al., 2015). Sobre estas condições, os efeitos sinérgicos da eutrofização e mudanças climáticas levarão a expansão das florações das cianobactérias tóxicas e sua dominância sobre demais espécies fitoplactônicas (PAERL e OTTEN, 2016). Tal fato deve ocorrer devido ao aumento da temperatura induzir o crescimento, aumentar a taxa fotossintética e a difusão de nutrientes para a superfície celular, diminuir a viscosidade e tensão superficial da água, além de intensificar e prolongar a estratificação vertical, promovendo maior vantagem competitiva às cianobactérias (O'NEIL et al., 2012).

O sucesso das cianobactérias em ambientes hipereutrofizados e temperaturas mais quentes deve-se às características ecofisiológicas destes organismos, como a presença de vesículas de gás que permitem a regulação e flutuabilidade na coluna d'água, possibilitando o rápido ajuste vertical e favorecendo a aquisição de nutrientes e luz, além de permitir colonização em faixas mais superficiais (CAREY et al., 2012). Além destes fatores, as cianobactérias apresentam ainda alta afinidade e capacidade de estocar fósforo,

fixação de nitrogênio, produção de acinetos, tolerância a baixas intensidades de luz e produção de substâncias alelopáticas (PAERL e HUISMAN, 2009).

A alelopatia é uma interação competitiva baseada na excreção de compostos inibitórios ou substâncias para a comunicação química (DUNKER; JAKOB; WILHELM, 2013), os quais podem causar respostas fisiológicas estimulando ou inibindo o crescimento, podendo ocasionar a morte em consequência da inibição da fotossíntese ou rompimento da membrana celular (LEFLAIVE e TEM-HAGE, 2007; ZHU et al, 2014; POULSON-ELLESTADA et al., 2014; SONG et al., 2017). A excreção de compostos alelopáticos vem sendo sugerida como um importante mecanismo de vantagem competitiva, o qual confere dominância a espécies melhores competidoras em condições de estresses ambientais, e pode atuar como um mecanismo de defesa contra herbivoria (LEFLAIVE e TEM-HAGE, 2007). Entretanto, os efeitos da alelopatia podem variar em função da fase de crescimento, densidade celular das espécies alelopáticas e alvo, e por limitação de recursos (GRANÉLI; WEBERG; SALOMON, 2008; MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013).

O papel e mecanismo das interações alelopáticas entre espécies de algas e cianobactérias potencialmente produtora de toxinas vem sendo amplamente investigada (LEÃO et al., 2009; RZYMSKI et al., 2014; SONG et al., 2017; CHIA et al., 2018), e apesar de alguns estudos relacionarem a excreção de substâncias alelopáticas com a produção de cianotoxinas (LEFLAIVE e TEM-HAGE, 2007), a importância das interações alelopáticas no estabelecimento de cianobactérias tóxicas ainda não foi relatado (SONG et al., 2017). Acredita-se, que objetivo primário das toxinas seja inibir o crescimento de outras espécies competidoras, exercendo importante papel na sucessão ecológica (GRANÉLI et al., 2008; DUNKER; JAKOB; WILHELM, 2013).

As cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique e Salerno e *Microcystis eruginosa* (Kützing) Kützing são formadoras de florações tóxicas, que co-ocorrem e/ou tem dominância (SOARES et al., 2009). Florações destas espécies vêm ocorrendo de forma mais frequente e intensa em consequência da eutrofização e do aumento da temperatura (GER; HANSSON; LÜRLING, 2014). A *R. raciborskii* é uma cianobactéria diazotrófica filamentosa com tricomas retos ou enrolados, produz acinetos, heterócitos terminais, e vem sendo extensivamente estudada por sua toxicologia (BONILLA et al., 2012; BURFORD et al., 2014; THOMAS e LITCHEMAM, 2016; XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017; PANOU et al., 2018; GALVANESE et al., 2019). Essa espécie possui uma alta plasticidade

fenotípica (BONILLA et al., 2012), sendo capaz de sobreviver em baixas intensidades de luz (KEHOE, 2010), apresenta crescimento ótimo em torno de 29 a 31°C, podendo ser encontrada em temperaturas entre 19 a 35°C, e consegue sobreviver sob limitação de fósforo e nitrogênio (BRIAND et al., 2004; BURFORD et al., 2016). *Microcystis aeruginosa*, por sua vez é uma cianobactéria conhecida por formar florações em todo o mundo, a qual pode apresentar forma unicelular ou colonial com presença de mucilagem, que confere defesa contra herbivoria, agente bacterianos e a compostos alelopáticos (RIOS et al., 2016). Esta espécie possui o crescimento em temperatura máxima de 28°C (MANTZOUKII et al., 2016), apresenta vesículas de gás que a confere flutuabilidade vertical na coluna d'água, além de ser uma boa competidora por luz, favorecida por altas concentrações de nutrientes (HARKE et al., 2016). *Raphidiopsis raciborskii* é produtora das cianotoxinas cilindrospermopsina e saxitoxina, enquanto *M. aeruginosa* é produtora da hepatotoxina microcistina, tais cianotoxinas têm sido consideradas como compostos alelopáticos capazes de inibir o crescimento de espécies concorrentes (ANTUNES; LEÃO; VASCOCELLOS, 2012; DZIALLAS e GROSSART, 2011; RZYMSKI et al., 2014; WANG et al., 2017; MIOTTO et al., 2017).

Em ecossistemas de água doce, essas espécies têm apresentado dominância sobre outras cianobactérias e algas verdes (XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017). Em alguns reservatórios tropicais, a *R. raciborskii* tem substituindo ou co-dominando outras espécies de cianobactérias como a *M. aeruginosa* e *Dolichospermum* spp. A substituição de outras cianobactérias pela *R. raciborskii* pode estar relacionada com as condições ambientais, como a limitação de recursos, que determina o tamanho da população (MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013), MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013), ou mesmo a sua alta plasticidade e tolerância a ambientes limitados por luz, nutrientes, capacidade de liberar substâncias alelopáticas e inibir o crescimento de espécies simpáticas (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007).

O aumento dos níveis de nutrientes e temperaturas vêm sendo considerados fatores importantes que favorecem as florações de cepas tóxicas, e conseqüentemente, maior biossíntese de toxinas (DAVIS et al., 2009; EL-SHEHAWY et al., 2012). Em ambientes hipertróficos, a competição por interferência pode ser considerada com maior importância (DUNKER; JAKOB; WILHEM, 2013), visto que, variações nos níveis desses estressores influenciam as interações entre espécies, estimulando ou inibindo a produção de metabólitos secundários, tornando competidores fracos mais vulneráveis a aleloquímicos (CHIA et al., 2018). Compreender a variação entre cepas de cianobactérias

é um importante mecanismo que ajuda prever florações sob diferentes condições ambientais (XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017).

Apesar das interações entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* terem sido documentadas em diferentes condições de luz, temperaturas, pH e nutrientes (MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013; THOMAS e LITCHEMAM, 2016; XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017; BRITO; DUARTE-NETO; MOLICA, 2018), os efeitos sinérgicos do aumento da temperatura e concentrações de nutrientes sobre estas cianobactérias de forma isoladas, bem sobre as interações alelopáticas entre estas espécies ainda não foram investigados.

Uma das grandes preocupações com a frequência e intensidade das florações de cianobactérias está relacionada a sua capacidade em produzir e liberar altas concentrações de cianotoxinas, capazes de representar sérios riscos à saúde humana, causar redução na biodiversidade na comunidade de algas, zooplâncton e peixes, ocasionando impacto negativo no gerenciamento e custos na qualidade da água e no funcionamento dos serviços ecossistêmicos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Neste sentido, compreender os efeitos combinados do aumento dos níveis de nutrientes e temperaturas no estabelecimento de espécies tóxicas, bem como sobre as interações entre espécies concorrentes produtoras de cianotoxinas é de suma importância para prever futuras florações e auxiliar na criação de possíveis planos de manejo para mitigar estes efeitos.

2. HIPÓTESES

H1: As alterações nas condições nutricionais e de temperatura influenciam mudanças na taxa de crescimento das cianobactérias *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* e estimulam a produção de cianotoxinas.

H2: As alterações nas condições nutricionais e de temperatura direcionam interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*, induzindo a redução do crescimento de *M. aeruginosa* e a liberação de cianotoxinas por *R. raciborskii*.

H3: Maiores concentrações de nutrientes e temperaturas sobre as interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* irá promover a dominância de *R. raciborskii* sobre *M. aeruginosa*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos das alterações nas condições de temperatura e nutrientes sobre as interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* e determinar o papel das cianotoxinas nessa relação.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os efeitos isolados e combinados das variações na temperatura e nas concentrações dos nutrientes (nitrogênio e fósforo) no crescimento e produção de toxinas nas monoculturas das cianobactérias *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*.
- Determinar os efeitos isolados e combinados das variações na temperatura e nas concentrações dos nutrientes nas interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*.
- Avaliar os efeitos das concentrações de nutrientes e temperaturas sobre as concentrações de toxinas de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* durante interações alelopáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, J. T.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* strain LEGE 99043. **Microbial ecology**, 64 (3) 584-592. 2012.

BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA M.; FABRE A.; HUSZAR V. L.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK J.; KRUK C.

What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **FEMS Microbiol. Ecol.** 79, 594-607. 2012.

BRIAND, J. F.; LÉBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P. CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII (CYANOBACTERIA) INVASION AT MID-LATITUDES: SELECTION, WIDE PHYSIOLOGICAL TOLERANCE, OR GLOBAL WARMING? **Journal of Phycology**, 40(2), 231-238. 2004.

BRITO, M. T. D. S.; DUARTE-NETO, P. J.; MOLICA, R. J. R. *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* competing under different conditions of pH and inorganic carbon. **Hydrobiologia**, 815 (1), 253-266. 2018.

BURFORD, M. A.; BEARDALL, J.; WILLIS, A.; ORR, P.T.; MAGALHÃES, V.F.; RANGEL, L.M.; NEILAN, B.A. Compreendendo as estratégias vencedoras utilizadas pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, formadora de flores. **Algas nocivas**, 54, 44-53. 2016.

CAO, X.; WANG, J.; LIAO, J.; SUN, J.; HUANG, Y. The threshold response of phytoplankton community to nutrient gradient in a shallow eutrophic Chinese lake. **Ecological Indicators**, 61, 258-267. 2016.

CAREY, C. C.; IBELINGS, B. W.; HOFFMANN, E. P.; HAMILTON, D. P.; BROOKES, J. D. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. **Water Research**, 46, 1394-1407. 2012.

CHATTERJEE, A.; PAL, S.; CHATTERJEE S. Bottom up and top down effect on toxin producing phytoplankton and its consequence on the formation of plankton bloom. **Applied Mathematics and computation**, 3387 – 3398. 2011.

CHIA, M. A.; JANKOWIAK, J. G.; KRAMER, B. J.; GOLESKI, J. A.; HUANG, I. S.; ZIMBA, P. V.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; GOBLER, C. J. Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena (Dolichospermum)* blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. **Harmful algae**, 74, 67-77. 2018.

DAVIS, T. W.; BERRY, D. L.; BOYER, G. L.; 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**, 8 (5), 715-725. 2009.

DESCY, J. P.; LEPRIEUR, F.; PIRLOT, S.; LEPORCQ, B.; VAN WICHELEN, J.; PERETYATKP, A.; TEISSIER, S.; CODD, G. A.; TRIEST, L.; VYVERMAN, W.; WILMOTTE, A. Identifying the factors determining blooms of cyanobacteria in a set of shallow lakes. **Ecological Informatics**, 34, 129-138. 2016.

DZIALLAS, CLAUDIA; GROSSART, HANS-PETER. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. **PLoS One**, 6, 9, e25569. 2011.

DUNKER, S.; JAKOB, T.; WILHELM, C. Contrasting effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and physiology of two green algae, *Oocystis marsonii* and *Scenedesmus obliquus*, revealed by flow cytometry. **Freshwater Biology**, 58, 1587-1587. 2013.

EL-SHEHAWY, R.; GOROKHOVA, E.; FERNANDEZ-PINAS, F.; DEL CAMPO, F. F. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: what can we learn from experiments? **Water Research**, 46 (5), 1420-1429. 2012.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? **Journal of Phycology**, 43(2), 256-265. 2007.

GER, K. A.; HANSSON, L. A.; LURLING. Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. **Freshwater Biology**, 59, 1783-1798. 2014.

GLOBER, C. J.; BURKHOLDER, J. M.; DAVIS, T. W.; HARKE, M. J.; JOHNGEN, T.; STOW, C. A.; WAAL, D. B. V. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. **Harmful Algae**, 54, 87-97. 2016.

GRANELI, EDNA; WEBERG, MARTIN; SALOMON, PAULO S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. **Harmful algae**, 8 (1), 94-102. 2008.

HARKE, M.J.; GOBLER, C.J. Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. **PLOS ONE**, 8 (7), E69834. 2013.

KEHOE, M. **Modelling of physical and physiological processes controlling primary production and growth in toxic filamentous cyanobacteria**. 2010. Tese de Doutorado. PhD Thesis. University of Queensland, Australia.

LEÃO, Pedro N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. **European Journal of Phycology**, 44 (3), 347-355. 2009.

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

MARINHO, M. M.; SOUZA, M. B. G.; LÜRLING, M. Light and phosphate competição between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* is strain dependente. **Microbiology of Aquatic systems**. 2013.

MIOTTO, M C.; COSTA, L D F.; BRENTANO, D M, NADER, C.; DOS SANTOS SOUZA, L.; GRESSLER, P. D.; RÖRIG, L. R. Caracterização ecofisiológica e perfil de toxinas de duas linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas de uma lagoa subtropical no sul do Brasil. **Hydrobiologia**, 802 (1), 97-113. 2017.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A; GLOBER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, 14, .313-334. 2012.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology**, 27-37. 2009.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water research**, 46, 1349-1363. 2012.

PAERL, H.W.; GARDNER, W. S.; HAVENS, K. E.; JOYNER, A. R.; MCCARTHY, M. J.; NEWELL, S. E.; QIN, B.; SCOTT, J. T. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. **Harmful Algae**, 54, 213-222. 2016.

PANOU, M.; ZERVOU, S. K.; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; GKELIS, S. A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: Missing link in tropic invader's phylogeography tale. **Harmful algae**, 80, 96-106. 2018.

POULSON-ELLESTAD, K. L.; JONES, C. M.; ROY, J.; VIANT, M. R.; FERNÁNDEZ, F. M.; KUBANEK, J.; NUNN, B. L. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. **Proceedings of the national academy of sciences**, 111(24), 9009-9014. 2014.

RECKNAGEL, F.; ORR, P. T.; BARTKOW, M.; SWANEPOEL, A.; CAO, H. Early warning of limit-exceeding concentrations of cyanobacteria and cyanotoxins in drinking water reservoirs by inferential modelling. **Harmful algae**, 69, 18-27, 2017.

RIOS, J. F.; LEAL, C. R.; JANAINA, R.; RETZ, C. L.. Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains. **Annals of microbiology**, 66 (3), 1265-1276. 2016.

RZYMSKI, P.; PONIEDZIAŁEK, B.; KOKOCIŃSKI, M.; JURCZAK, T.; LIPSKI, D.; WIKTOROWICZ, K. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: *Cylindrospermopsis* and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, 35, 1-8. 2014.

SONG, H.; LAVOIE, M.; FAN, X.; TAN, H.; LIU, G.; XU, P; QIAN, H. Allelopathic interactions of linoleic acid and nitric oxide increase the competitive ability of *Microcystis aeruginosa*. **The ISME journal**, 11(8), 1865. 2017.

THOMAS, M. K.; LITCHMAN, E. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. **Hydrobiologia**, 763 (1), 357-369. 2016.

WALLS, J. T.; WYATT, K. H.; DOLL, J. C.; RUBENSTEIN, E. M.; ROBER, A. R. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, 610, 786-795. 2018.

WANG, Z.; LI, D.; CAO, X.; SONG, C.; ZHOU, Y. Photosynthesis regulates succession of toxic and nontoxic strains in blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria). **Phycologia**, 54(6), 640-648. 2015.

WANG, L.; ZI, J.; XU, R.; HILT, S.; HOU, X.; CHANG, X. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing. **Harmful algae**, 61, 56-62. 2017.

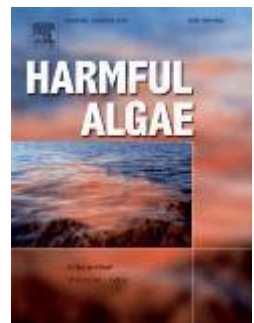
XIAO, M.; WILLIS, A.; BURFORD, M. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. **Harmful algae**, 62, 84-93. 2017.

YANG, B.; JIANG, Y.J.; HE, W.; LIU, W.X.; KONG, X. Z.; JØRGENSEN, S. E.; XU, F. L. The tempo-spatial variations of phytoplankton diversities and their correlation with trophic state levels in a large eutrophic Chinese lake. **Ecological Indicators**, 66, 153-162. 2016.

ZHU, Z.; LIU, Y.; ZHANG, P.; ZENG, G.; HU, X.; LI, H.; GUO, Y.; GUO, X. Co-culture with *Cyperus alternifolius* induces physiological and biochemical inhibitory affects in *Microcystis aeruginosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 56, 118-124. 2014.

ARTIGO I-

Artigo a ser submetido à revista:



Alterações nas interações alelopáticas entre *Raphidiopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* em função de diferentes formas de nitrogênio, fósforo e condições de temperaturas

Ranielle Daiana dos Santos Silva^a, Mathias Ahii Chia^b, José Etham de Lucena Barbosa^a

^aÁrea de Ecologia, Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba- UEPB, Rua Baraúnas, nº. 351, Universitário, 58.429-500, Campina Grande, PB, Brasil.

^bÁrea de Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Ahmadu Bello, 81 0001, Zaria, Nigéria.

*Autor para correspondência: ethambarbosa@hotmail.com

Resumo

O aumento da temperatura global e a eutrofização dos ecossistemas aquáticos têm promovido a intensificação das florações de cianobactérias e aumentado a produção de cianotoxinas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das mudanças de temperatura e condições nutricionais nas interações alelopáticas entre as cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Foram realizados experimentos de cultura mista, meio livre de células e co-cultura em câmaras particionadas com cepas de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Os experimentos foram realizados nas temperaturas 24 °C e 30 °C e meio ASM-1 modificado, com concentrações elevadas de nitrato (7 mmol NaNO₃), ureia (CH₄N₂O 50 mM), e fosfato (350 µmol de Na₂PO₃). As culturas foram incubadas durante oito dias, as amostras para medições do número de células, biomassa e conteúdo de cianotoxinas foram coletadas em dias alternados. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) de três fatores para verificar a influência da temperatura e dos nutrientes no biovolume, concentração de toxinas, taxas de crescimento e taxa de inibição das cepas. Altos níveis de nitrato e fosfato mostraram induzir o crescimento das cianobactérias, enquanto a uréia não mostrou ser ideal para o crescimento destes organismos. *Raphidiopsis raciborskii* apresentou maior crescimento do que *M. aeruginosa* em monocultura ou durante os experimentos de competição. O aumento da temperatura mostrou elevar o crescimento populacional de *R. raciborskii* e redução do volume celular desta espécie, verificamos que a temperatura intensificou as interações entre as espécies, promovendo maior vantagem competitiva a *R. raciborskii*. O aumento da temperatura levou o aumento da produção de microcistina e redução do conteúdo de saxitoxina em monocultura, por outro lado, durante a competição a temperatura elevada aumentou as concentrações de saxitoxinas. Os resultados encontrados neste estudo, sugerem que o aumento da temperatura e nutrientes (nitrato e fosfato) nos ecossistemas levará a dominância de *R. raciborskii* sobre *M. aeruginosa*.

Palavras-Chave: Eutrofização, Aquecimento global, Florações de cianobactérias, Cianotoxinas.

1. INTRODUÇÃO

Atividades antropogênicas, como o uso indiscriminado de fertilizantes orgânicos e inorgânicos e a descarga de efluentes industriais e domésticos, levam ao enriquecimento dos ecossistemas aquáticos com diferentes formas de nitrogênio e fósforo, processo denominado eutrofização (PAERL e HUISMAN, 2009; O'NEIL et al., 2012; PHAM et al., 2016; MANTZOUKI et al., 2016). As alterações das formas e níveis desses nutrientes direcionam processos sucessionais de organismos fitoplanctônicas de água doce em direção à formação de florações tóxicas de cianobactérias (BRIAND; LÉBOULANGER; HUMBERT, 2004; LURLING et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; MOWE et al., 2015; CAO et al., 2016; PHAM et al., 2016). Esses nutrientes são essenciais na formação de biomoléculas, como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e hormônios que regulam o crescimento das cianobactérias e produção de toxinas (VAN DE WAAL et al., 2014).

Juntamente com o aumento da temperatura global, a eutrofização dos ecossistemas aquáticos aumenta os riscos associados à proliferação excessiva de cianobactérias e suas toxinas (PAERL, 2008; O'NEIL et al., 2012; CHIA et al., 2018; WALLS et al., 2018). A elevação da temperatura influencia o crescimento, aumenta a taxa fotossintética, a difusão de nutrientes na superfície celular e intensifica a estratificação vertical, o que confere vantagem competitiva às cianobactérias nativas e invasivas (O'NEIL et al., 2012; THOMAS e LITCHEMAM, 2016). Além disso, estratégias ecológicas, como a formação de vesículas gasosas que regulam a flutuabilidade na coluna d'água, permitem um ajuste vertical rápido, otimizando a aquisição de nutrientes e luz (PAERL e HUISMAN, 2009).

O excesso ou limitação de nutrientes e a alta temperatura influenciam as interações entre espécies do fitoplâncton, levando à produção de aleloquímicos por cianobactérias que podem estimular ou inibir o crescimento de espécies concorrentes em seu ambiente imediato (GRANÉLI et al., 2008; GANTAR et al., 2008; ANTUNES; LEÃO; VASCOCELLOS, 2012; DUNKER; JAKOB; WILHELM, 2013; CHIA et al., 2018). As cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente conhecida com *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju) e *Microcystis eruginosa* (Kützing) Kützing formam florações tóxicas, e o sucesso destas espécies no ambiente tem sido associado à eutrofização e às mudanças climáticas globais (GER; HANSSON; LÜRLING, 2014). No entanto, ainda é pouco compreendido como esses fatores influenciam as interações alelopáticas entre as duas espécies.

Raphidiopsis raciborskii é uma espécie filamentosa diazotrófica, com presença de vesículas de gás e células de resistência (acinetos), tolerante a baixa intensidade luminosa e limitação de nutrientes (BUFORD et al., 2016; XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017; PANOU et al., 2018). Por outro lado, *M. aeruginosa* é uma espécie não diazotrófica, geralmente encontrada em forma de colônia, possui aerotópos que promovem a sua regulação na coluna d'água e tem preferência por maior intensidade de luz e altas concentrações de nutrientes (RIOS et al., 2016; HARKE et al., 2016).

Em ambientes tropicais, *Raphidiopsis raciborskii* alterna com *M. aeruginosa* durante sucessão ecológica (GRIFFITHS, 2001; GER; HANSSON; LÜRLING, 2014). A dominância dessas espécies está relacionada à sua alta plasticidade fenotípica e adaptações fisiológicas às mudanças nas condições físico-químicas (BONILLA et al., 2012; BUFORD et al., 2016). Quando dominantes, elas modificam os processos do ecossistema local por meio da produção e liberação de substâncias bioativas (THOMAS e LITCHEMAM, 2016). A inibição recíproca do crescimento foi relatada entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* durante competição por nutrientes, e inibição do crescimento de outras espécies do fitoplâncton (FIGUEREDO et al., 2004; FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007; RZYMSKI et al., 2014; WANG et al., 2017). Os exsudatos de *M. aeruginosa* inibem o crescimento e causam estresse oxidativo em espécies de fitoplâncton concorrentes (BÁRTOVÁ et al., 2011; WANG et al., 2015; CHIA et al. 2018).

A interação entre eutrofização e elevação de temperatura altera o metabolismo, a taxa de crescimento, a expansão e a toxicidade das florações de cianobactérias (PAERL e PAUL, 2012; PAERL et al., 2016). As florações de cianobactérias deterioram a qualidade da água em todo o mundo devido aos metabólitos secundários bioativos que produzem e liberam no ambiente (CAMPOS et al., 2013; PINEDA-MENDONZA et al., 2016; CHIA et al., 2019). Os metabólitos produzidos pelas cianobactérias são classificados como hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas, com base em seu mecanismo de toxicidade para animais selvagem, domésticos e seres humanos, e representam grande ameaça para a integridade ecológica e a sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos (PAERL e HUISMAN 2009). Várias dessas toxinas foram responsáveis por ocasionar doenças e mortes de animais domésticos, selvagens e seres humanos (GRIFFITHS 2003; BRIAND et al., 2008; MEREL et al., 2013).

Apesar da importância ecológica destas espécies, há escassez de informações sobre a influência das formas de nitrogênio, fósforo e aumento da temperatura nas interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Além disso, pouco foi feito

para entender as alterações fisiológicas e a produção de toxinas de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* durante interações alelopáticas sob diferentes temperaturas e nutrientes. Essas informações são fundamentais para a compreensão da função da alelopatia em processos sucessionais sob diferentes condições nutricionais e de temperatura nos ecossistemas aquáticos.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das mudanças de temperatura e condições nutricionais nas interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Nossas hipóteses são: (i) o aumento combinado da temperatura e das concentrações de nutrientes promove o crescimento e aumenta produção de cianotoxinas pelas cianobactérias investigadas; e (ii) as interações alelopáticas entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* induzem a redução do crescimento de *M. aeruginosa*, e a liberação de cianotoxinas de *R. raciborskii* sob condições diferentes de temperatura e nutrientes, promovendo a sua dominância.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cepas das cianobactérias

As linhagens produtoras de toxinas de *Microcystis aeruginosa* (Word Data Center Microorganisms 835) e *Raphidiopsis raciborskii* (ITEPA1) foram obtidas da coleção de culturas da Universidade de São Carlos e do Instituto de Tecnologia de Pernambuco, respectivamente. As cepas foram mantidas em meio de cultura ASM-1 (pH 8,0), sob condições ambientais controladas (60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e fotoperíodo 12:12 de ciclo claro:escuro).

2.2. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados utilizando cultura mista, meio livre de células e co-cultura em câmaras particionadas com variação das concentrações de nutrientes e temperaturas (Figura 1). Os experimentos de cultura mista, monoculturas e meio livre de células foram realizados em Erlenmeyers de 250 ml utilizando 200 ml de meio, enquanto as co-culturas foram realizadas em câmaras particionadas com volume total de 300 ml. As culturas foram incubadas com crescimento exponencial de cada cepa em um biovolume inicial de $4,0 \times 10^6 \mu\text{M}^3 \text{mL}^{-1}$.

Os experimentos foram realizados nas temperaturas 24 °C e 30 °C e meio ASM-1 modificado com altas concentrações de nitrato (7 mmol NaNO₃; MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013), ureia (CH₄N₂O 50 mM; SAKAMOTO e BRYANT, 1998), e fosfato (350 µmol de Na₂PO₃; PASSARGE, 2006). Os níveis selecionados de nitrato, ureia e fosfato representam aqueles comumente encontrados nos ecossistemas aquáticos eutróficos e hipertróficos (REYNOLDS, 2006; GOBLER et al., 2016). Entre os valores de temperatura a serem investigados, 24°C representa a temperatura média atual da água nas regiões semiáridas do Brasil e 30°C representam aumentos previstos (+ 6°C) nos valores globais de temperatura (EL-SHEHAWY et al., 2012; YANG et al., 2016). As culturas controle de ambas as linhagens foram mantidas no meio ASM-1.

As culturas foram incubadas por oito dias e as amostras foram coletadas em dias alternados (0, 2, 4, 6 e 8) para medições do número de células, biomassa e conteúdo de cianotoxinas.

2.3. Experimento de cultura mista

Os experimentos de cultura mista foram realizados baseado na interação direta das células de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Foram realizados experimentos de monocultura das cepas de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*.

2.4. Experimento com meio livre de célula

Os experimentos com meio livre de células consistiram na exposição de células de *R. raciborskii* a meio livre de células das cepas de *M. aeruginosa* (CrCFM), bem como a exposição de células de *M. aeruginosa* a meio livre de células das cepas de *R. raciborskii* (MaCFM) (Tabela 1).

Os meios de cultura livre de células (exsudatos) de ambas as linhagens foram obtidos por centrifugação de 50 mL de culturas em fase exponencial de crescimento de ambas as linhagens por 10 minutos a 2000 rpm, posteriormente o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de fibra de vidro. Este processo foi utilizado a fim de romper as células das cepas (HARKER e GLOBER, 2013). O meio livre de células teve o biovolume celular inicial de $4,0 \times 10^6 \mu\text{M}_3 \text{mL}^{-1}$. O meio livre de células foi suplementado com os níveis de nutrientes encontrados no meio ASM-1, e o meio modificado com alta concentração de nitrato, ureia e fosfato, evitando que os crescimentos das cepas fossem limitados por

nutrientes.

2.5 Experimento de co-cultivo em câmaras particionadas

O experimento compreendeu na co-existência da cepa de *Microcystis* com cepa de *Raphidiopsis*. Foram realizados a fim de monitorar os efeitos da alelopatia por meio do contato indireto das células de ambas as espécies sobre as condições nutricionais e de temperaturas propostos. A câmara particionada foi constituída por dois frascos de cultura de células de pescoço canted Corning de 200 ml de poliestileno em forma de U separados por uma membrana de nylon de tamanho de malha de 0,22 μm . As culturas de fase de crescimento exponencial ($4.0 \times 10^6 \text{ mm}^3 \text{ mL}^{-1}$ de biovolume) de cada cepa foram adicionadas por compartimento de um par de câmara dividida separada por uma membrana. As câmaras apresentaram um volume total de 300 mL de meio ASM-1 por combinação das duas cepas selecionadas. Todas os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.6 Coleção de dados

As densidades celulares foram determinadas usando uma câmara de contagem Brightline Neubauer aprimorada sob um microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e o biovolume foi obtido seguindo as formas geométricas descritas em Hillebrand et al. (1999), considerando a dimensão média de 20 indivíduos.

A taxa de crescimento (μ ; dia^{-1}) foi calculada de acordo com a fórmula de regressão exponencial $\mu = (\ln(N_t) - \ln(N_{t_0})) / (t - t_0)$, onde N representa o valor do biovolume no tempo final (t) e no tempo inicial (t_0) (WOOD et al., 2005). O efeito inibitório da exposição de uma espécie a sua concorrente foi calculada com a formula da taxa de inibição (IR%): $\text{IR}\% = ((N_m - N_c) / N_c) \times 100$, onde N_m representa o biovolume das cepas exposta a espécie concorrente e N_c representa o biovolume no controle. Todos os dados experimentais foram expressos com média \pm DP.

As concentrações totais das cianotoxinas microcistinas LR e saxitoxinas foram extraídas de amostras de cultura congeladas em tubos de microcentrífugas de 2,0 ml. As amostras foram submetidas a três ciclos de congelamentos e descongelamentos. As análises foram realizadas pelo método *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) utilizando kits em placa Abraxis, Inc. (Warminster, Pa) específicos para cada toxina,

seguindo as instruções do fabricante. As análises foram realizadas com o auxílio de um leitor de microplacas ASYS A-5301 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Áustria). O método ELISA é amplamente utilizado para detecção e quantificação de cianotoxinas, e os resultados são significativamente correlacionados ($R=0.96$; $p<1.10^{-10}$) com os obtidos usando HPLC e LC-MS (BABICA et al., 2006; BLÁHOVÁ et al., 2009).

Tabela 1. As diferentes combinações experimentais utilizadas nos experimentos de monocultura e meio livre de células. *M. aeruginosa* e *R. raciborskii* representam linhagens tóxicas. *R.raciborskii* + MaCFM representa células de *Raphidiopsis* exposta ao meio livre de células de *Microcystis* e *M.aeruginosa* + CrCFM representa células de *Microcystis* expostas ao meio livre de células de *Raphidiopsis*. O controle é o meio de cultivo normal (ASM-1), em cada condição de temperatura há concentrações de nitrato, ureia e fósforo.

Experimento	Cepas	Temperatura (°C)	Nutrientes
1	<i>M. aeruginosa</i>	24°C	Controle
	<i>R. raciborskii</i>	24°C	Controle
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	24°C	Controle
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	24°C	Controle
1	<i>M. aeruginosa</i>	24°C	Nitrato
	<i>R. raciborskii</i>	24°C	Nitrato
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	24°C	Nitrato
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	24°C	Nitrato
1	<i>M. aeruginosa</i>	24°C	Uréia
	<i>R. raciborskii</i>	24°C	Uréia
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	24°C	Uréia
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	24°C	Uréia
1	<i>M. aeruginosa</i>	24°C	Fósforo
	<i>R. raciborskii</i>	24°C	Fósforo
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	24°C	Fósforo
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	24°C	Fósforo
2	<i>M. aeruginosa</i>	30°C	Controle
	<i>R. raciborskii</i>	30°C	Controle
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	30°C	Controle
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	30°C	Controle
2	<i>M. aeruginosa</i>	30°C	Nitrato
	<i>R. raciborskii</i>	30°C	Nitrato
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	30°C	Nitrato
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	30°C	Nitrato
2	<i>M. aeruginosa</i>	30°C	Uréia
	<i>R. raciborskii</i>	30°C	Uréia
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	30°C	Uréia
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	30°C	Uréia
2	<i>M. aeruginosa</i>	30°C	Fósforo
	<i>R. raciborskii</i>	30°C	Fósforo
	<i>M.aeruginosa</i> + CrCFM	30°C	Fósforo
	<i>R. raciborskii</i> + MaCFM	30°C	Fósforo

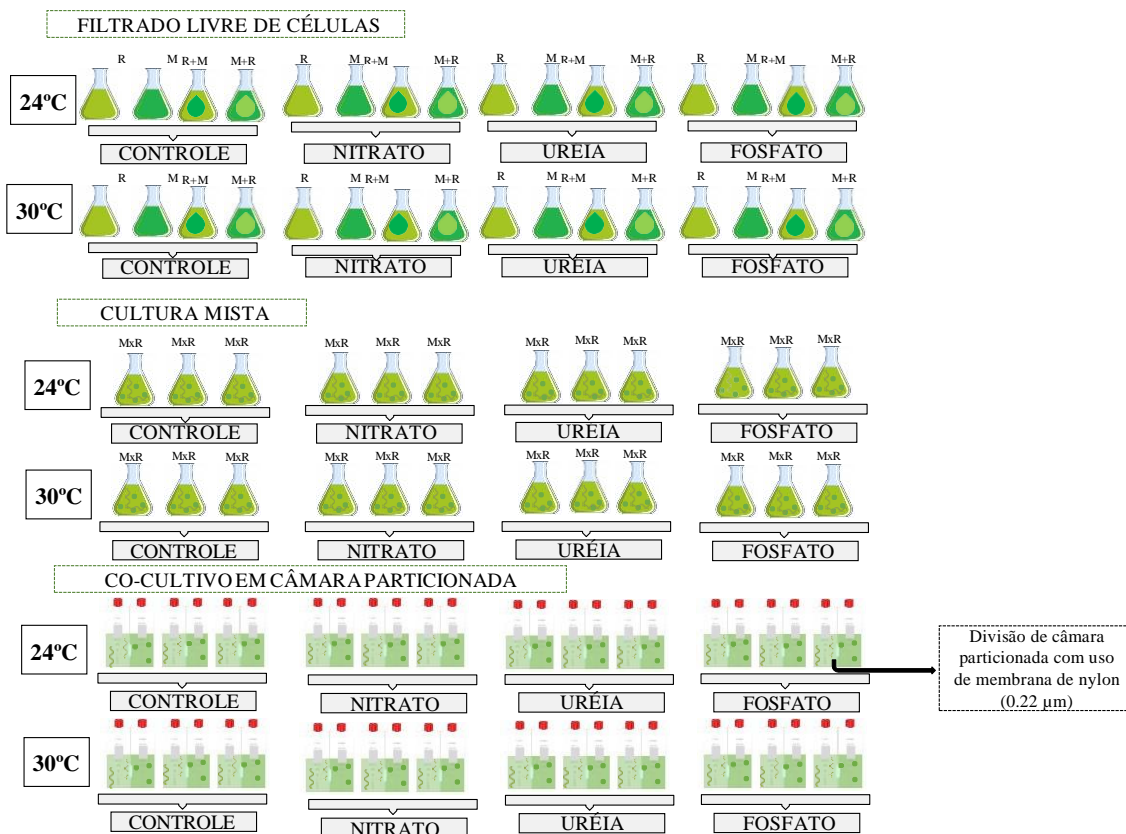


Figura 1. Delineamento experimental. Experimentos em meio livre de células, cultura mista e co-cultivo em câmaras particionadas.

2.7 Análise estatística

A normalidade e homogeneidade das variâncias foram avaliados com os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. A ANOVA de três fatores foi realizado por meio do modelo linear generalizado (GLM) para verificar a influência da temperatura, dos nutrientes e variação nos tratamentos (monocultura e culturas expostas a espécie concorrente) biovolume, concentração de toxinas, taxas de crescimento e taxa de inibição de cada cepa durante o tempo de incubação. Quando verificadas diferenças significativas nos testes da ANOVA, foi realizado o teste a posteriori de Tukey para comparação múltipla das médias. As análises estatísticas foram realizadas a nível de significância de 5% usando o programa Statical Package for the Social Siences (SPSS) e R software para Windows.

3. RESULTADOS

3.1 Experimentos de cultura mista de *R. raciborskii* e *M. Aeruginosa*

Em todos os experimentos de cultura mista, *R. raciborskii* apresentou uma contribuição relativa significativamente maior do que *M. aeruginosa* em todas as condições nutricionais, exceto em meio enriquecido com uréia, onde *R. raciborskii* não conseguiu crescer (Figura 2). A elevação da temperatura favoreceu ainda mais o biovolume celular de *R. raciborskii*, promovendo maior contribuição relativa desta espécie para o biovolume total da cultura mista em todas as condições nutricionais.

As taxas de crescimento de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* em cultura mista reduziram com o tempo sendo menor no último dia de incubação nas duas temperaturas ($p < 0.05$). As maiores taxas de crescimento específico de *M. aeruginosa* ocorreram sob as condições de controle e nitrato na temperatura de 24°C (Figura 3). Enquanto *R. raciborskii* apresentou as maiores taxas de crescimento específico nas condições controle e 24°C (Figura 3).

Os resultados da ANOVA mostraram que as interações dias, temperaturas e tratamentos foram significativos ($p < 0.05$) (tabelas 2 e 3) para as taxas de inibição, verificamos que *R. raciborskii* inibiu fortemente o crescimento de *M. aeruginosa* na temperatura de 24°C, enquanto que os efeitos de inibição de *M. aeruginosa* sobre *R. raciborskii* foram leves (Figura 4). Na temperatura de 30°C, *M. aeruginosa* teve seu crescimento estimulado na condição controle, e *R. raciborskii* foi estimulada nas condições controle, nitrato e fosfato (Figura 4).

Tabela 2: Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em cultura mista; ns, não significativo.

Fatores	<i>Microcystis aeruginosa</i> em cultura mista											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Microcistina		
	df	F	p	Df	F	P	Df	F	p	Df	F	p
Dias	1	538.35	<0.01	1	6.95	<0.01	4	13.43	0.00	1	0.02	ns
Dias:Nutrientes	3	79.68	<0.01	3	9.72	<0.01	12	19.31	0.00	3	4.14	<0.01
Dias:Temperatura	1	38.90	<0.01	1	0.38	ns	4	36.92	0.00	1	0.06	ns
Dias:Tratamentos	1	77.56	<0.01	1	60.47	<0.01	0	-	ns	1	0.00	ns
Dias:Nutrientes:Temperatura	3	11.77	<0.01	3	11.07	<0.01	12	18.58	0.00	3	0.16	ns
Dias:Nutrientes:Tratamentos	3	10.16	<0.01	3	12.75	<0.01	0	-	0.00	3	4.03	0.00
Dias:Temperatura:Tratamentos	1	10.66	<0.01	1	5.35	0.02	0	-	0.00	1	0.08	ns
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	3	6.32	<0.01	3	6.10	0.00	0	-	ns	3	0.15	ns

Tabela 3: Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em cultura mista; ns, não significativo.

Fatores	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> em cultura mista											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Saxitoxina		
	df	F	p	Df	F	P	Df	F	p	Df	F	P
Dias	1	473.09	<0.01	1	6.95	<0.01	4	109.57	0.00	1	198.05	<0.01
Dias:Nutrientes	3	59.33	<0.01	3	9.72	<0.01	12	52.72	0.00	3	26.35	<0.01
Dias:Temperatura	1	43.83	<0.01	1	0.38	Ns	4	79.66	0.00	1	3.35	ns
Dias:Tratamentos	1	1.38	<0.05	1	60.47	<0.01	0	ns	ns	1	202.43	<0.01
Dias:Nutrientes:Temperatura	3	6.67	<0.01	3	11.07	<0.01	12	12	0.00	3	4.25	<0.01
Dias:Nutrientes:Tratamentos	3	2.79	<0.05	3	12.7	<0.01	0	ns	ns	3	27.02	<0.01
Dias:Temperatura:Tratamentos	1	17.16	<0.01	1	5.35	0.02	0	ns	ns	1	2.85	ns
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	3	7.44	<0.01	3	6.10	<0.01	0	ns	ns	3	4.37	0.00

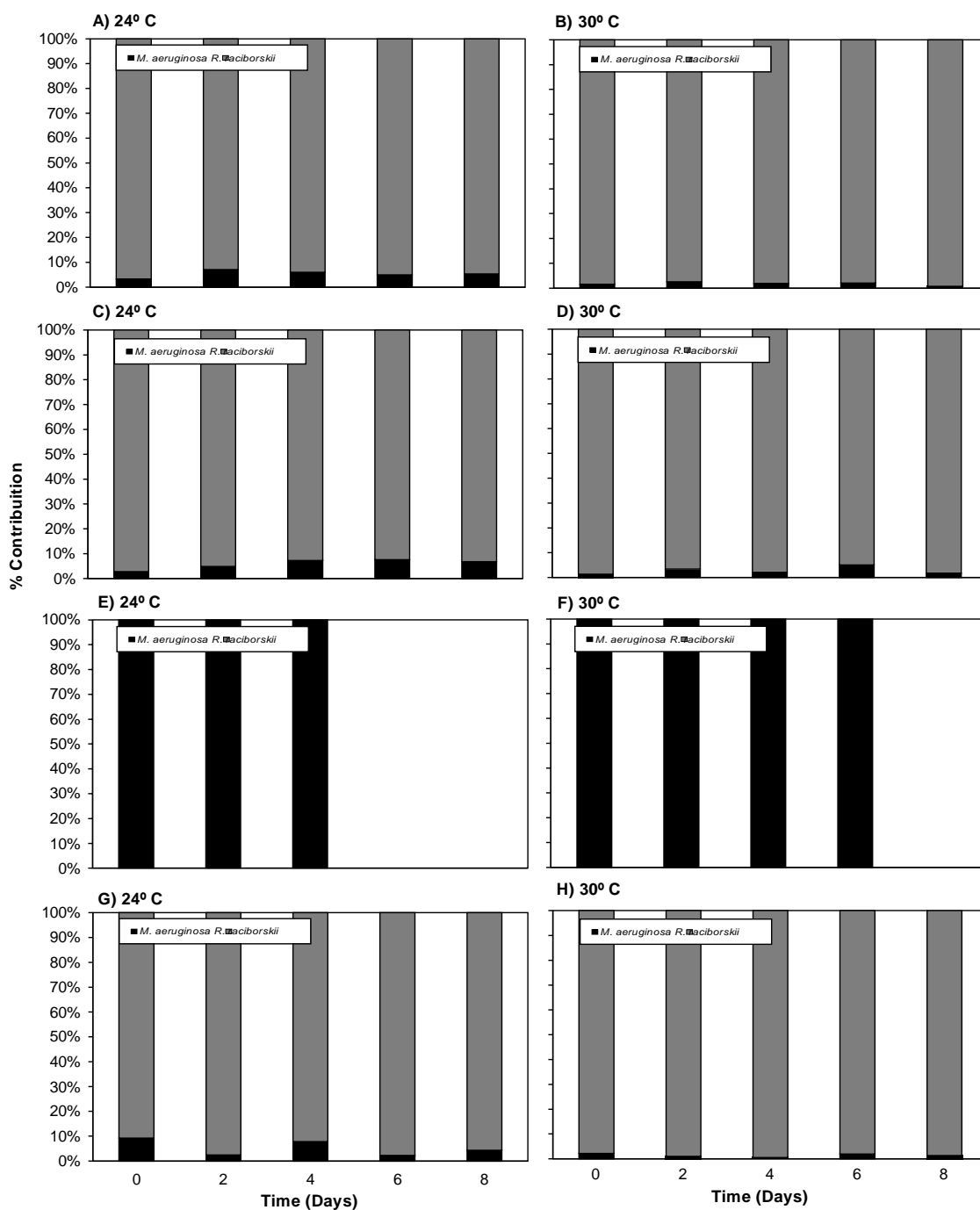


Figura 2. Contribuição relativa (%) do biovolume celular ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$) das culturas mistas nas condições de A= controle em 24°C, B= controle em 30°C, C= nitrato em 24°C, D= nitrato em 30°C, E= uréia 24°C, F= uréia 30°C, G=fosfato 24°C, H= fosfato 30°C.

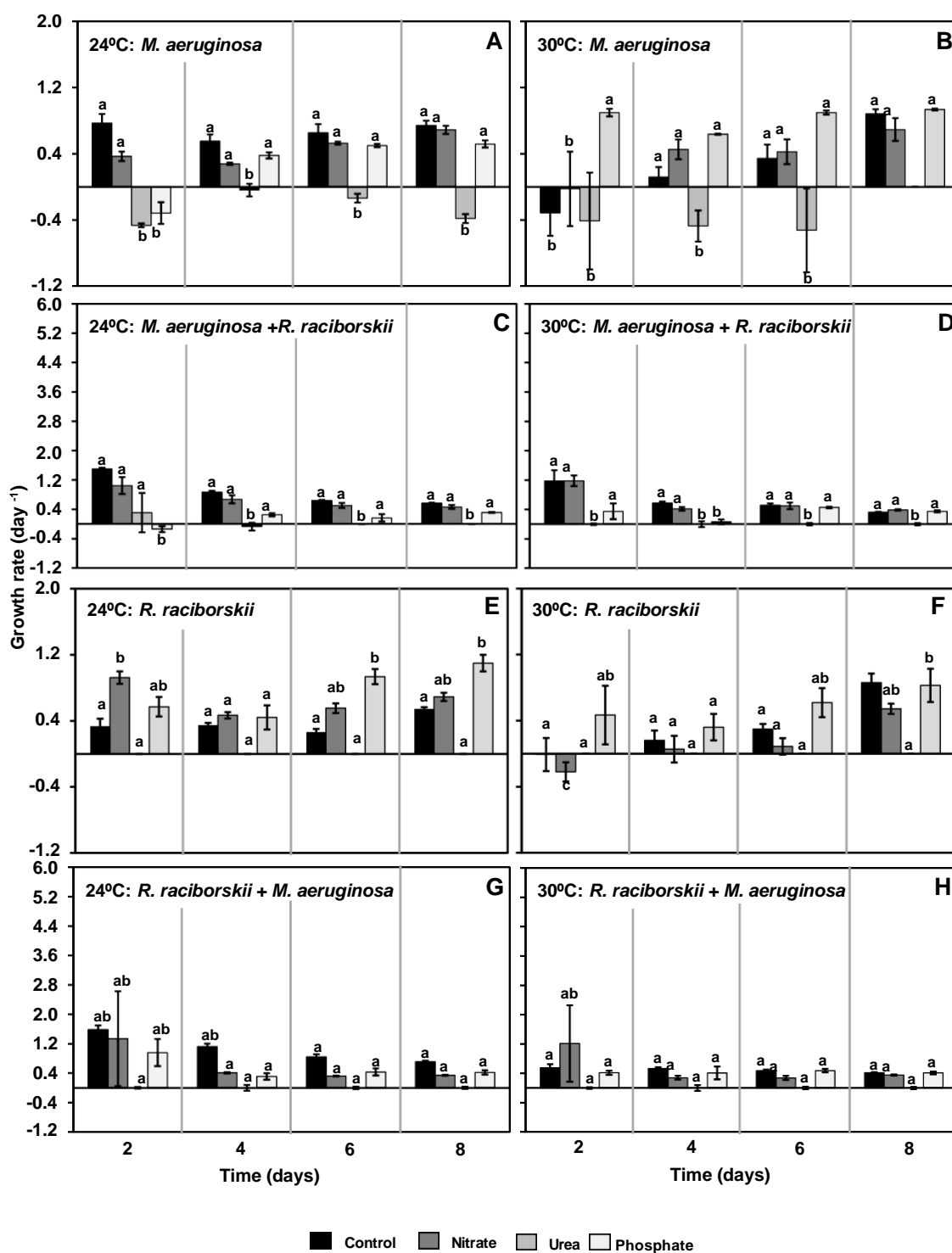


Figura 3. Taxa de crescimento específico. A= *M. aeruginosa* em cultura mista com *R. raciborskii* em 24°C, B= *M. aeruginosa* em cultura mista com *R. raciborskii* em 30°C, C= *R. raciborskii* em cultura mista com *M. aeruginosa* em 24°C, D= *R. raciborskii* em cultura mista com *M. aeruginosa* em 30°C. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

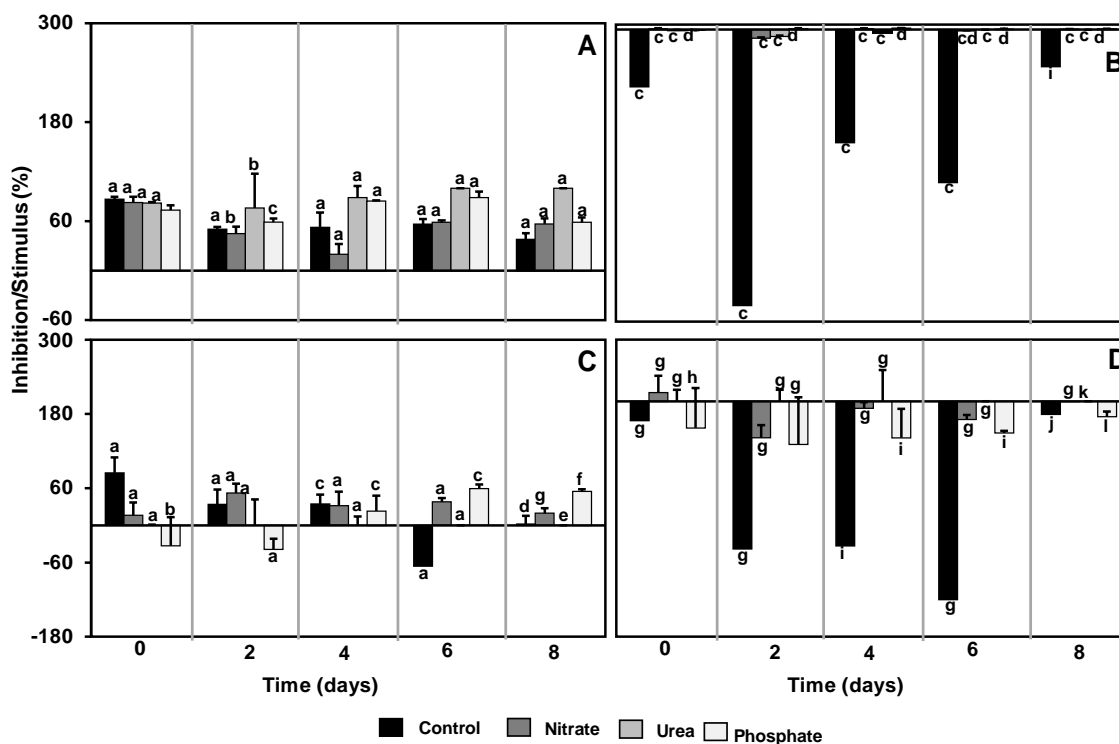


Figura 4. Taxa de inibição/estímulo de crescimento. *M. aeruginosa* em cultura mista 24° (A); *M. aeruginosa* em cultura mista 30° (B); *R. raciborskii* em cultura mista 24°C (C); *R. raciborskii* em cultura mista 30°C (D). Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

O meio com uréia não foi ideal para o crescimento das espécies, por este motivo, não foram realizadas análises de saxitoxinas e microcistinas com os experimentos de uréia.

Na cultura mista, *R. raciborskii* produziu concentração de saxitoxina significativamente menor em comparação com a monocultura. A elevação da temperatura resultou na inibição da produção de saxitoxina pela monocultura de *R. raciborskii*, enquanto que na cultura mista as interações entre dias, temperaturas e nutrientes influenciaram as concentrações de saxitoxinas, sendo estas significativamente maiores ($p < 0.05$) (Figura 5). As maiores concentrações de saxitoxinas na cultura mista ocorreram no oitavo dia de incubação, nas condições nutricionais de fosfato ($2.25 \mu\text{g/L}$) em 24°C, e nitrato ($2.02 \mu\text{g/L}$). Com relação as microcistinas, observamos maiores concentrações ($p < 0.05$) em culturas mistas. Verificamos que não ocorreu variação significativa ($p = 0.80$) entre os dias e temperaturas, enquanto a relação entre os dias e nutrientes influenciaram significativamente a variação nas concentrações de microcistina, com maiores

concentrações registradas nas condições controle ($1.5 \mu\text{g L}^{-1}$) no dia dois e nitrato ($1.5 \mu\text{g L}^{-1}$) no dia oito (Figura 6).

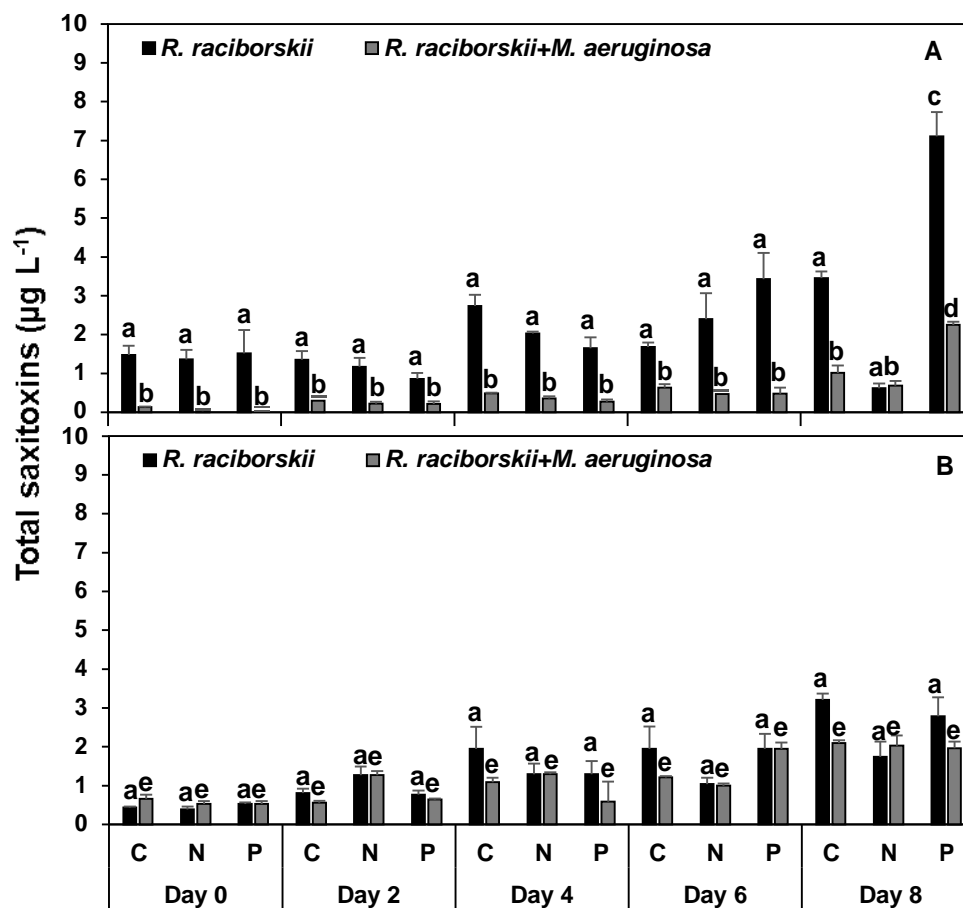


Figura 5. Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, e cultura mista de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. A= 24°C, B= 30°C. C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

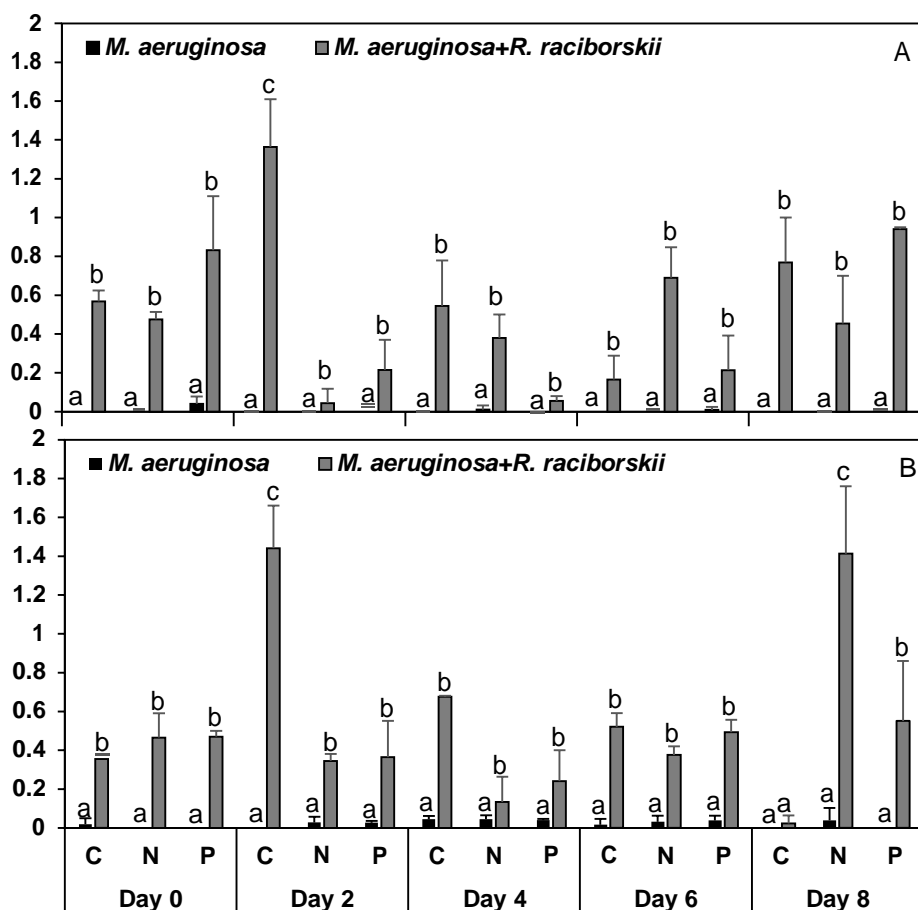


Figura 6. Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, e cultura mista de *M. aeruginosa* e *R. raciborskii*. A= 24°C, B= 30°C. C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

3.2 Experimento com meio livre de células de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*

Os maiores biovolume ($12.08 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) da cepa de *M. aeruginosa* em monocultura ocorreram sob temperatura de 24 °C em elevadas concentrações de nitrato (Figura 7). Enquanto que os tratamentos expostos ao meio livre de células de *R. raciborskii*, *M. aeruginosa* apresentou uma redução significativa do biovolume celular, sendo maior no sexto dia de incubação ($8.36 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) sob condições de fosfato e temperatura de 24°C (Figura 7). Nas faixas com temperatura mais elevada foi registrada a redução do biovolume celular de *M. aeruginosa*, especialmente quando exposta ao meio livre de células de *R. raciborskii*.

A monocultura de *R. raciborskii* apresentou maior biovolume ($168.56 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) sob 24°C em fosfato, e em concentrações de nitrato ($153.27 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) em 30°C (Figura 7). Por outro lado, a exposição de *R. raciborskii* ao meio livre de células de *M. aeruginosa* também mostrou a inibição do crescimento desta cepa, apresentando biovolume celular de $117.64 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 7), entretanto, condições de maior temperatura e elevadas concentrações de fosfato estimularam significativamente o aumento do biovolume de *R. raciborskii* ($165.27 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) (Figura 7). A temperatura mais elevada promoveu redução no biovolume de *R. raciborskii* se comparado aos experimentos na temperatura de 24°C , tal fato coincidiu com a redução do volume celular nos experimentos de 30°C (Figura 8), indicando que o aumento da temperatura levou a redução do volume celular de *R. raciborskii*. Já *M. aeruginosa* não pareceu ter seu volume celular influenciado pelas alterações da temperatura, apresentando seu volume celular (Figura 8) seguindo o mesmo padrão observado em biovolume (Figura 7).

Raphidiopsis raciborskii apresentou biovolume celular significativamente maior que *M. aeruginosa* tanto em monocultura, quanto em exposição ao meio livre de células de *M. aeruginosa*.

O meio com altas concentrações de uréia não mostrou ser ideal para o crescimento das espécies causando efeito inibitório nas taxas de crescimento. *M. aeruginosa* apresentou maior tolerância ao meio com uréia, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas no biovolume das espécies (Figura 7). A permanência de *R. raciborskii* em uréia ocorreu apenas no primeiro dia de incubação em temperatura de 30°C . Os filamentos de *R. raciborskii* apresentaram esbranquecimento celular, presença de heterócitos em alguns tricomas, seguidos de morte celular.

As taxas de crescimento aumentaram com o tempo de incubação para ambas as espécies. A ANOVA mostrou que houve interação significativa ($p < 0.05$) entre os nutrientes, temperaturas, tratamentos e dias no crescimento (tabela 4 e 5). Maiores taxas de crescimento foram verificadas nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa* na temperatura de 30° , enquanto que *R. raciborskii* apresentou maior taxa de crescimento específico sobre temperatura de 24°C , ambas em condições nutricionais de elevadas concentrações de fosfato (figura 9).

Tabela 4. Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a meio livre de células de *R. raciborskii* sob diferentes condições de temperaturas e nutrientes; ns, não significativo.

Fatores	<i>Microcystis aeruginosa</i> em meio livre de células de <i>Raphidiopsis raciborskii</i>											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Microcistina		
	df	F	p	Df	F	p	Df	F	p	df	F	p
Dias	4	43.35	0.00	1	174.91	<0.001	4	377	ns	4	43.35	0.00
Dias:Nutrientes	12	6.14	0.00	3	25.70	<0.001	8	301	0.05	12	6.14	0.00
Dias:Temperatura	4	29.67	0.00	1	3.19	ns	0	-	ns	4	29.67	0.00
Dias:Tratamentos	4	28.76	0.00	1	0.93	ns	-	-	ns	4	28.76	0.00
Dias:Nutrientes:Temperatura	12	4.18	0.00	3	0.63	ns	0	-	ns	12	4.18	0.00
Dias:Nutrientes:Tratamentos	12	4.26	0.00	3	0.42	ns	-	-	ns	12	4.26	ns
Dias:Temperatura:Tratamentos	4	33.06	0.00	1	0.05	ns	0	-	ns	4	33.06	0.00
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	12	4.62	0.00	3	0.49	ns	-	-	ns	12	4.62	0.00

Tabela 5. Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a meio livre de células de *M. aeruginosa* sob diferentes condições de temperaturas e nutrientes; ns, não significativo.

Fatores	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> em meio livre de células de <i>Microcystis aeruginosa</i>											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Saxitoxina		
	df	F	p	Df	F	p	Df	F	p	df	F	p
Dias	4	293.43	0.00	3	346.01	0.00	4	4.78	0.02	4	106.108	0.00
Dias:Nutrientes	12	37.74	0.00	9	60.78	0.00	8	5.16	0.00	12	29.47	0.00
Dias:Temperatura	4	19.34	0.00	3	102.37	0.00	0	-	ns	4	13.03	0.00
Dias:Tratamentos	5	7.18	0.00	3	4.02	ns	-	-	ns	4	5.91	0.00
Dias:Nutrientes:Temperatura	12	3.55	0.00	9	54.30	0.00	0	-	ns	12	13.03	0.00
Dias:Nutrientes:Tratamentos	12	3.05	0.01	9	5.24	0.00	-	-	ns	12	5.51	0.00
Dias:Temperatura:Tratamentos	4	2.58	ns	3	1.88	ns	-	-	ns	4	17.82	0.00
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	12	7.47	0.00	9	6.36	0.00	-	-	ns	12	4.82	0.00

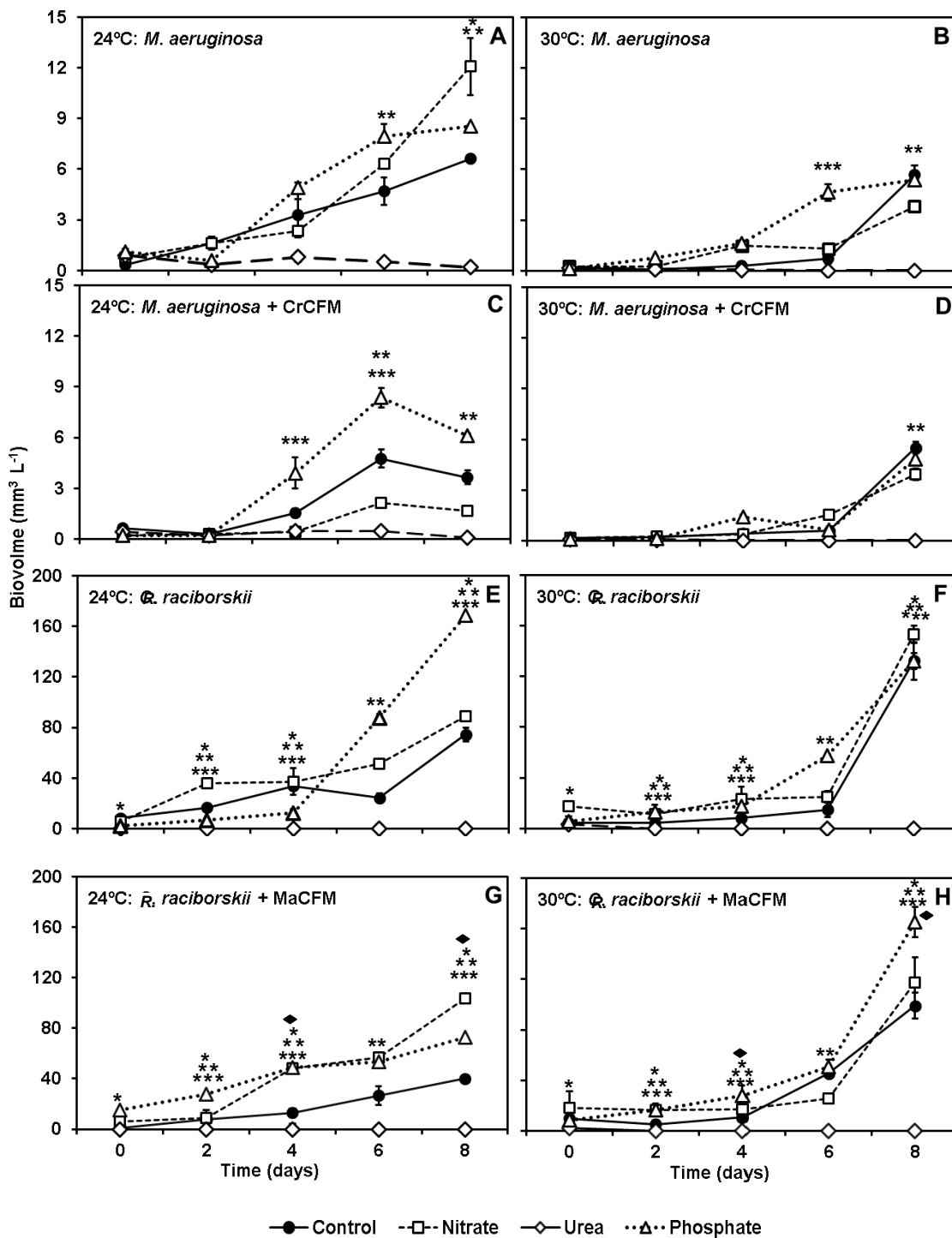


Figura 7. Biovolume (mm³ L⁻¹) de A= monocultura de *M. aeruginosa* em 24°C, B= monocultura de *M. aeruginosa* em 30°C, C= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* em 24°C, D= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *C. raciborskii* em 30°C, E= monocultura de *C. raciborskii* em 24°C, F= monocultura de *C. raciborskii* em 30°C, G= *C. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 24°C, H= *C. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 30°C. *= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre Fosfato e Controle; ◆= Diferença significativa de biovolume de *C. raciborskii* na presença de filtrado livre de células de *M. aeruginosa*;

◇ = Diferença significativa de biovolume de *M. aeruginosa* na presença de filtrado livre de células de *C. raciborskii*.

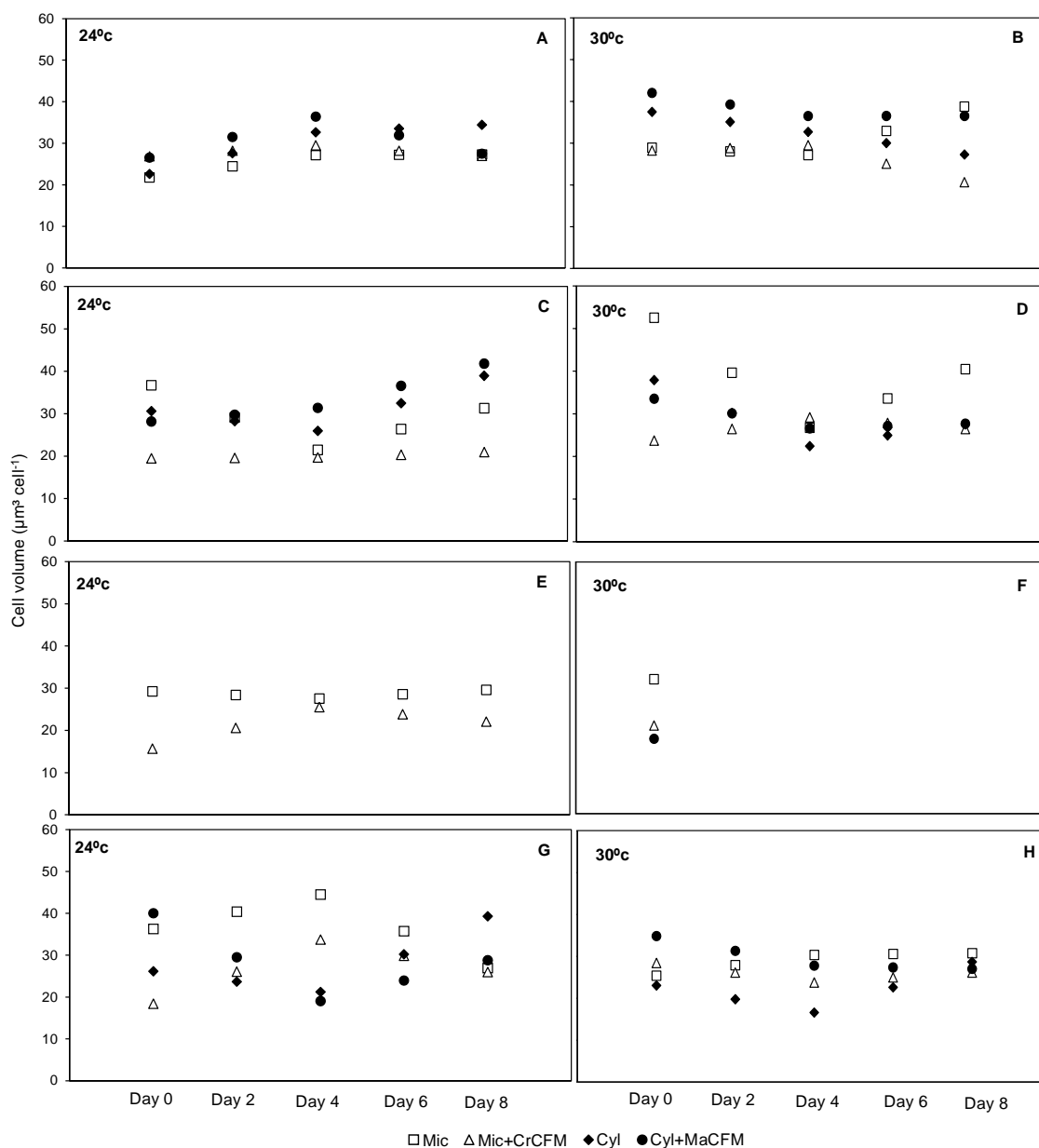


Figura 8. Volume celular ($\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$) de monocultura de *M. aeruginosa* = Mic, células de *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* = Mic+CrFM, monocultura de *R. raciborskii* = Cyl, células de *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* = Cyl+MaCFM. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.

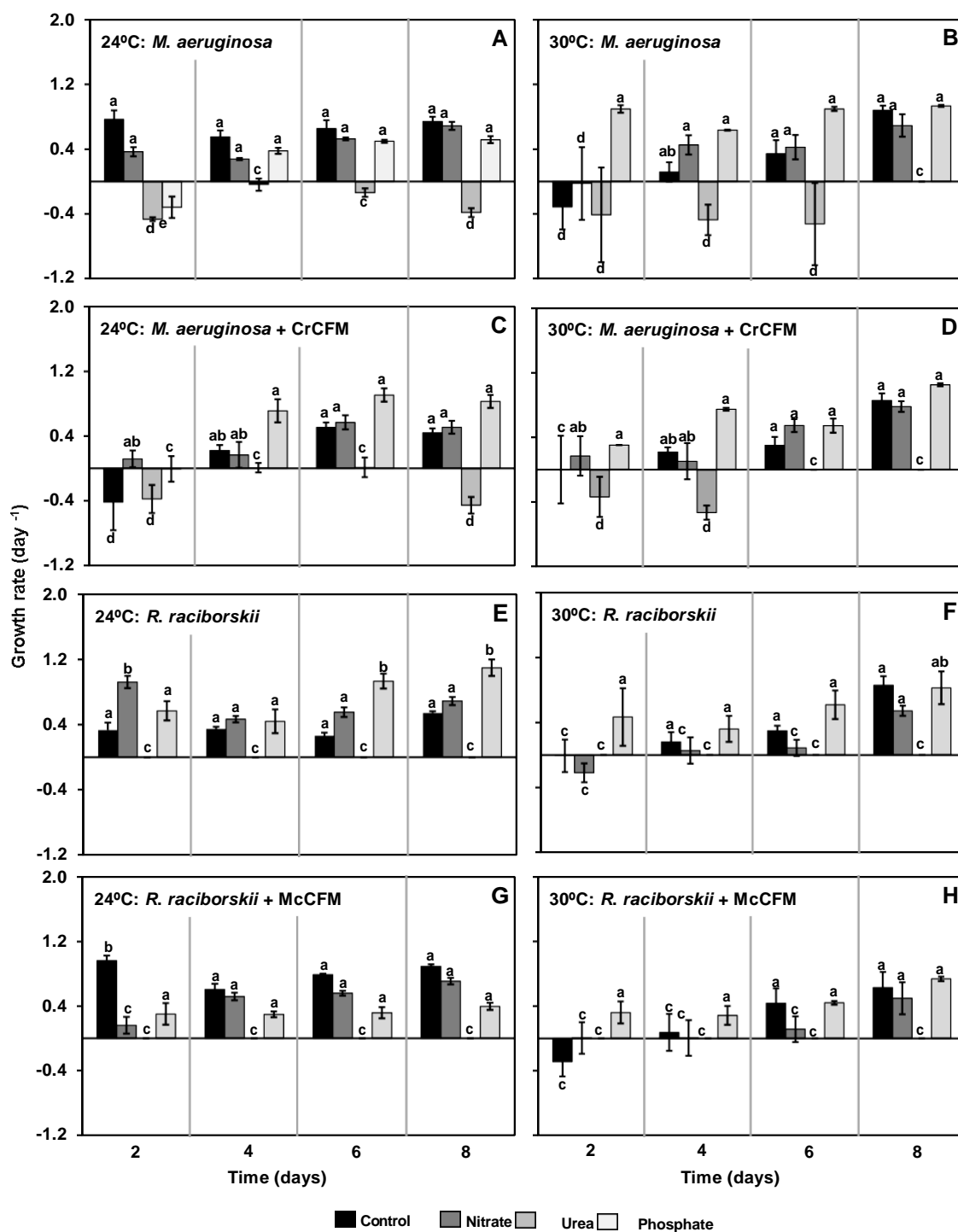


Figura 9. Taxa de crescimento específico. A= monocultura de *M. aeruginosa* em 24°C, B= monocultura de *M. aeruginosa* em 30°C, C= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* em 24°C, D= *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* em 30°C, E= monocultura de *R. raciborskii* em 24°C, F= monocultura de *R. raciborskii* em 30°C, G= *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 24°C, H= *R.*

raciborskii em meio livre de células de *M. aeruginosa* em 30°C. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

Os resultados da ANOVA indicaram interações significativas entre os nutrientes e dias na inibição ($p < 0.05$) (tabela 4 e 5). A incubação de *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* resultou na inibição do crescimento, tendo efeito significativo negativo sobre a biomassa de *M. aeruginosa* desde início da incubação, o efeito foi amenizado nos dias seis e oito. Em contrapartida, a exposição de *R. raciborskii* ao meio livre de células de *M. aeruginosa* estimulou o crescimento da espécie, especialmente em altas concentrações de fosfato até o quarto dia, apresentando baixa inibição no sexto e oitavo dia de experimento em 24°C. A estimulação do crescimento de *R. raciborskii* foi maior durante a exposição a temperatura de 24 °C (figura 10).

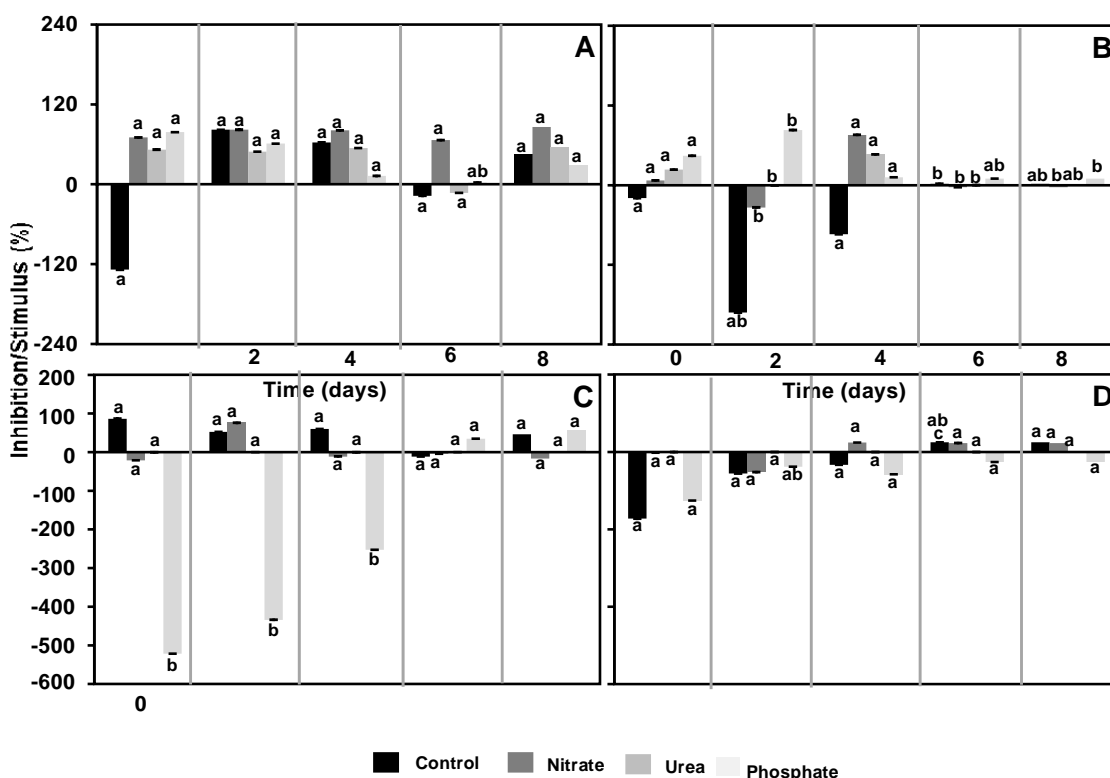


Figura 10. Taxa de inibição/estímulo de crescimento. *M. aeruginosa* + CrCFM em 24° (A); *M. aeruginosa* + CrCFM em 30° (B); *R. raciborskii* + MaCFM em 24°C (C); *R. raciborskii* + MaCFM em 30°C. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

Interações entre a dias, temperatura, nutrientes e tratamentos foram significativos sobre o conteúdo de saxitoxinas (tabela 5). As concentrações de saxitoxinas apresentaram maiores valores sob condições de fosfato em 24°C, enquanto as menores concentrações ocorreram em nitrato na temperatura de 30°C. O conteúdo de saxitoxina foi inibido quando *R. raciborskii* foi cultivada em meio isento de células de *M. aeruginosa* nas duas temperaturas testadas, sendo as maiores concentrações registradas durante o experimento em vinte e quatro graus e fosfato (5.22 µg/L) (figura 11).

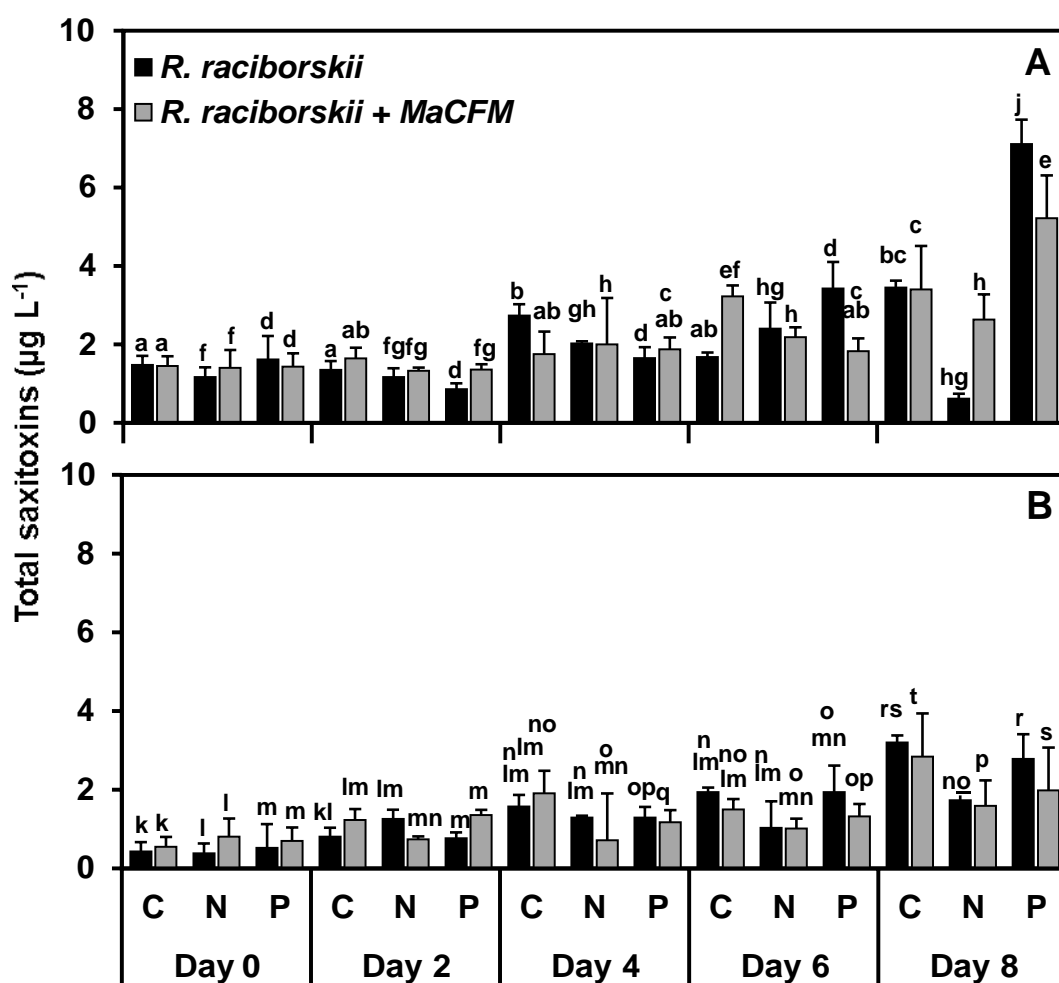


Figura 11. Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, e *R. raciborskii* em meio livre de células de *M. aeruginosa* (MaCFM). A= 24°C, B= 30°C. C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

Com relação as concentrações de microcistinas, observamos que houve efeito significativo sobre as interações entre a dias, nutrientes, temperaturas e tratamentos nas concentrações de microcistinas (Figura 12). As maiores concentrações de microcistinas foram registradas nos experimentos de monocultura em nitrato (0.12 $\mu\text{g/L}$) e (0.06 $\mu\text{g/L}$) nitrato no experimento em que *M. aeruginosa* foi exposta ao meio livre de células de *R. raciborskii*, o que indica que a saxitoxina presente no meio livre de células de *R. raciborskii* inibiu a produção de microcistina e induziram a necrose celular de *M. aeruginosa*. Além disso, verificamos que a temperatura mais elevada exerceu forte influência no aumento do conteúdo de microcistina, tal fato coincidiu com a diminuição do biovolume celular de *M. aeruginosa*.

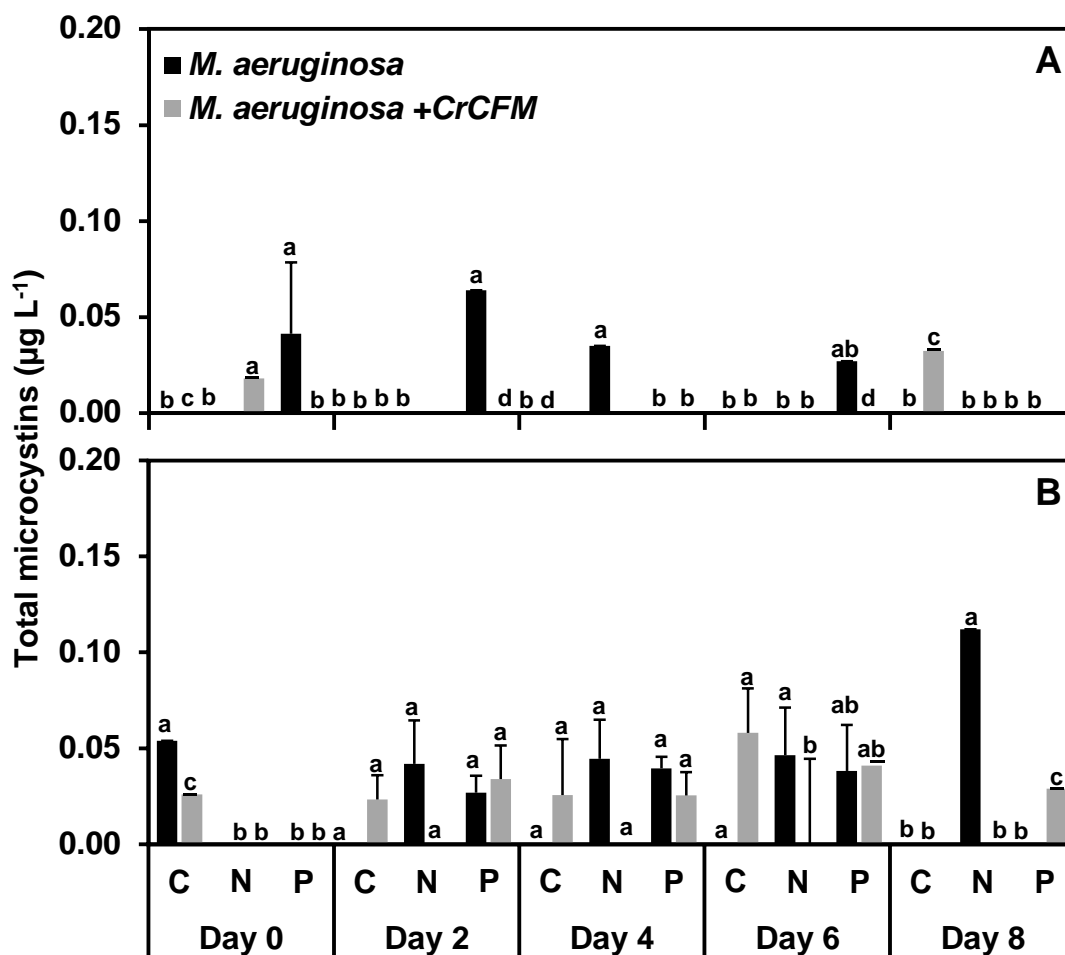


Figura 12. Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, e *M. aeruginosa* em meio livre de células de *R. raciborskii* (CrCFM). 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

3.3 Co-cultivo de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa* usando câmara particionada

O biovolume celular de *M. aeruginosa* foi maior em monocultura, enquanto nos tratamentos de co-cultivação apresentaram biovolume celular menores em todas as condições nutricionais (Figura 13). As interações entre os dias, nutrientes, temperaturas e tratamentos influenciaram significativamente ($p < 0.05$) o biovolume celular de *M. aeruginosa* (Tabela 7). O maior biovolume celular de *M. aeruginosa* ($4.28 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) durante a co-cultivação com *R. raciborskii* ocorreu na condição de nitrato em 30°C , os valores mais baixos foram encontrados sob condição de uréia nas temperaturas 24°C e 30°C . A temperatura mais elevada mostrou influenciar o aumento do biovolume celular de *M. aeruginosa* durante a co-cultivação em câmara particionada, entretanto o mesmo continuou abaixo do biovolume celular da espécie sob condições de monocultura (Figura 13).

Tabela 6: Resultados da Anova da exposição de *M. aeruginosa* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em câmara compartilhada; ns, não significativo.

Fatores	<i>Microcystis aeruginosa</i> em câmara compartilhada											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Microcistina		
	df	F	p	Df	F	p	df	F	p	Df	F	p
Dias	1	538.35	<0.01	1	21.10	<0.01	4	13.26	0.00	1	596.47	<0.01
Dias:Nutrientes	3	69.69	<0.01	3	8.56	<0.01	12	19.07	0.00	3	79.68	<0.01
Dias:Temperatura	1	15.25	<0.01	1	8.29	<0.01	4	36.46	0.00	1	38.90	<0.01
Dias:Tratamentos	1	125.83	<0.01	1	4.19	<0.01	0	-	ns	1	77.56	<0.01
Dias:Nutrientes:Temperatura	3	10.80	<0.01	3	32.92	<0.01	12	18.35	0.00	3	11.77	<0.01
Dias:Nutrientes:Tratamentos	3	23.21	<0.01	3	3.00	0.03	0	-	ns	3	10.16	<0.01
Dias:Temperatura:Tratamentos	1	35.26	<0.01	1	0.83	ns	0	-	ns	1	10.66	<0.01
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	3	8.66	<0.01	3	3.04	0.03	0	-	ns	3	6.32	<0.01

Tabela 7: Resultados da Anova da exposição de *R. raciborskii* a diferentes condições de temperaturas e nutrientes em câmara compartilhada; ns, não significativo.

Fatores	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> em câmara compartilhada											
	Biovolume			Crescimento			Inibição			Saxitoxina		
	df	F	p	Df	F	p	df	F	p	Df	F	p
Dias	1	94.41	<0.01	1	7.27	<0.01	4	124.34	0.00	1	4.75	<0.01
Dias:Nutrientes	3	16.62	<0.01	3	26.98	<0.01	12	59.82	0.00	3	2.82	<0.05
Dias:Temperatura	1	20.15	<0.01	1	0.81	ns	4	90.39	0.00	1	0.05	ns
Dias:Tratamentos	1	36.29	<0.01	1	19.35	<0.01	-	-	ns	1	4.56	<0.05
Dias:Nutrientes:Temperatura	3	13.93	<0.01	3	29.36	<0.01	12	51.05	0.00	3	2.63	<0.05
Dias:Nutrientes:Tratamentos	3	8.91	<0.01	3	0.79	ns	0	-	ns	3	2.78	<0.05
Dias:Temperatura:Tratamentos	1	24.33	<0.01	1	55.98	<0.01	0	-	ns	1	0.07	ns
Dias:Nutrientes:Temperatura:Tratamentos	3	11.07	<0.01	3	12.73	<0.01	0	-	ns	3	2.63	<0.05

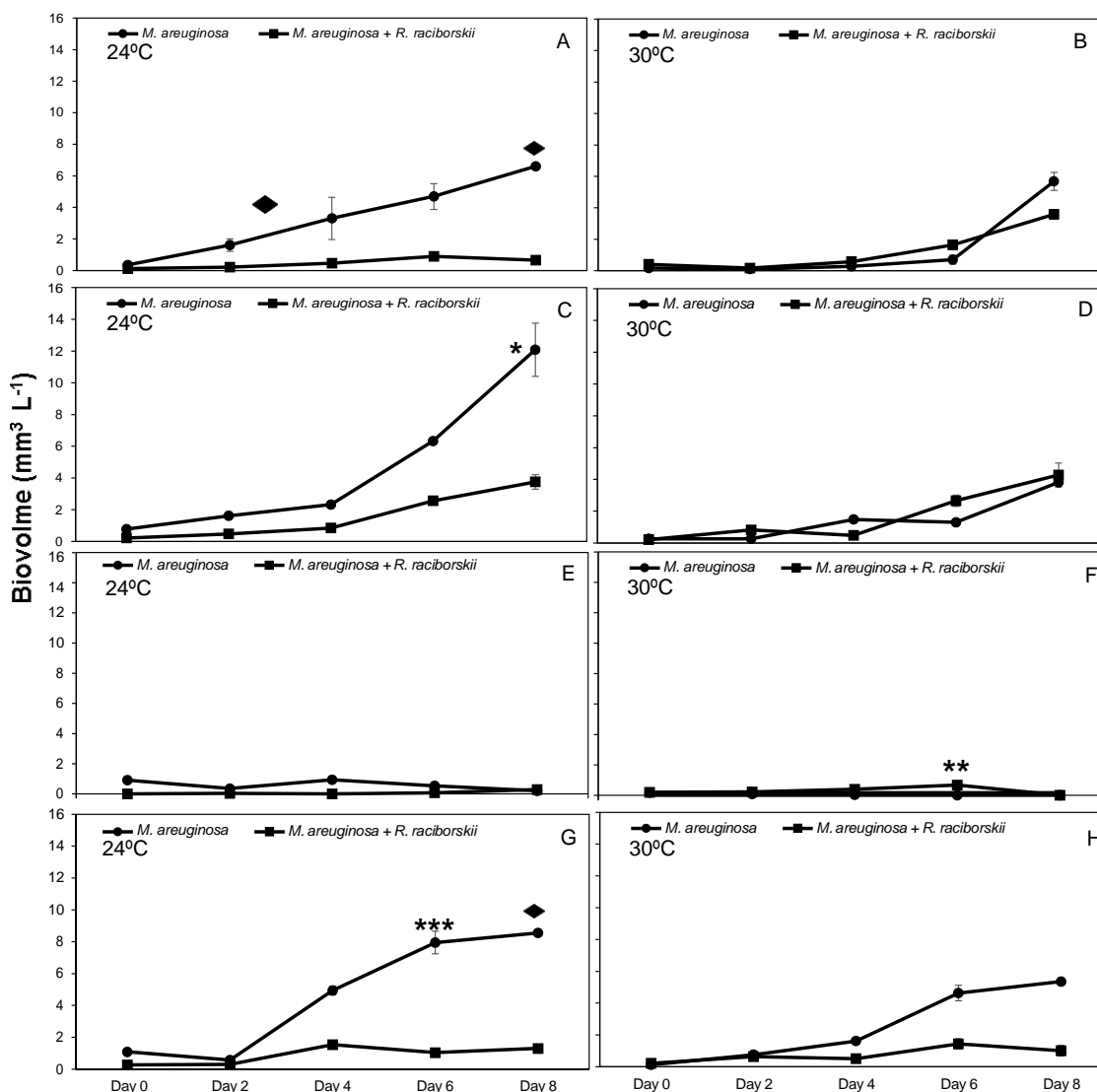


Figura 13: Biovolume de *M. aeruginosa* durante co-cultivação com *R. raciborskii* em câmara particionada. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.*= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre Fosfato e Controle; ◆ Diferença significativa de biovolume de *M. aeruginosa* durante a co-cultivação com *R. raciborskii* em câmara particionada.

Assim como *M. aeruginosa*, a espécie *R. raciborskii* durante a co-cultivação em câmara particionada apresentou significativa redução do biovolume celular em comparação como os experimentos de monocultura de *R. raciborskii*. Os resultados da ANOVA revelaram que as interações entre os dias, nutrientes, temperaturas e tratamentos foram significativas ($p < 0.01$) para o biovolume celular de *R. raciborskii* (Tabela 8). As interações entre estes fatores promoveram a inibição, causando a redução do biovolume celular de *R. raciborskii* durante a co-cultivação em câmara particionada. Nos experimentos de co-cultivação, o maior biovolume celular de *R. raciborskii* ($1808 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) ocorreu na condição nutricional de fosfato em 24°C (Figura 14). Em 30°C *R. raciborskii* teve seu biovolume reduzido significativamente ($p < 0.01$), com menores valores de ($293 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) no oitavo dia de incubação na condição controle, 30°C (Figura 14).

Diferentemente dos experimentos com o meio livre de células e cultura mista, o crescimento de *R. raciborskii* em câmara particionada com *M. aeruginosa* foi acompanhado pela alteração morfológica (ausência de divisão das células nos filamentos) e presença de vesículas distribuídas no filamento (Figura 15). Por este motivo, os resultados de biovolume de *R. raciborskii* na co-cultivação são expressos em biovolume por filamento.

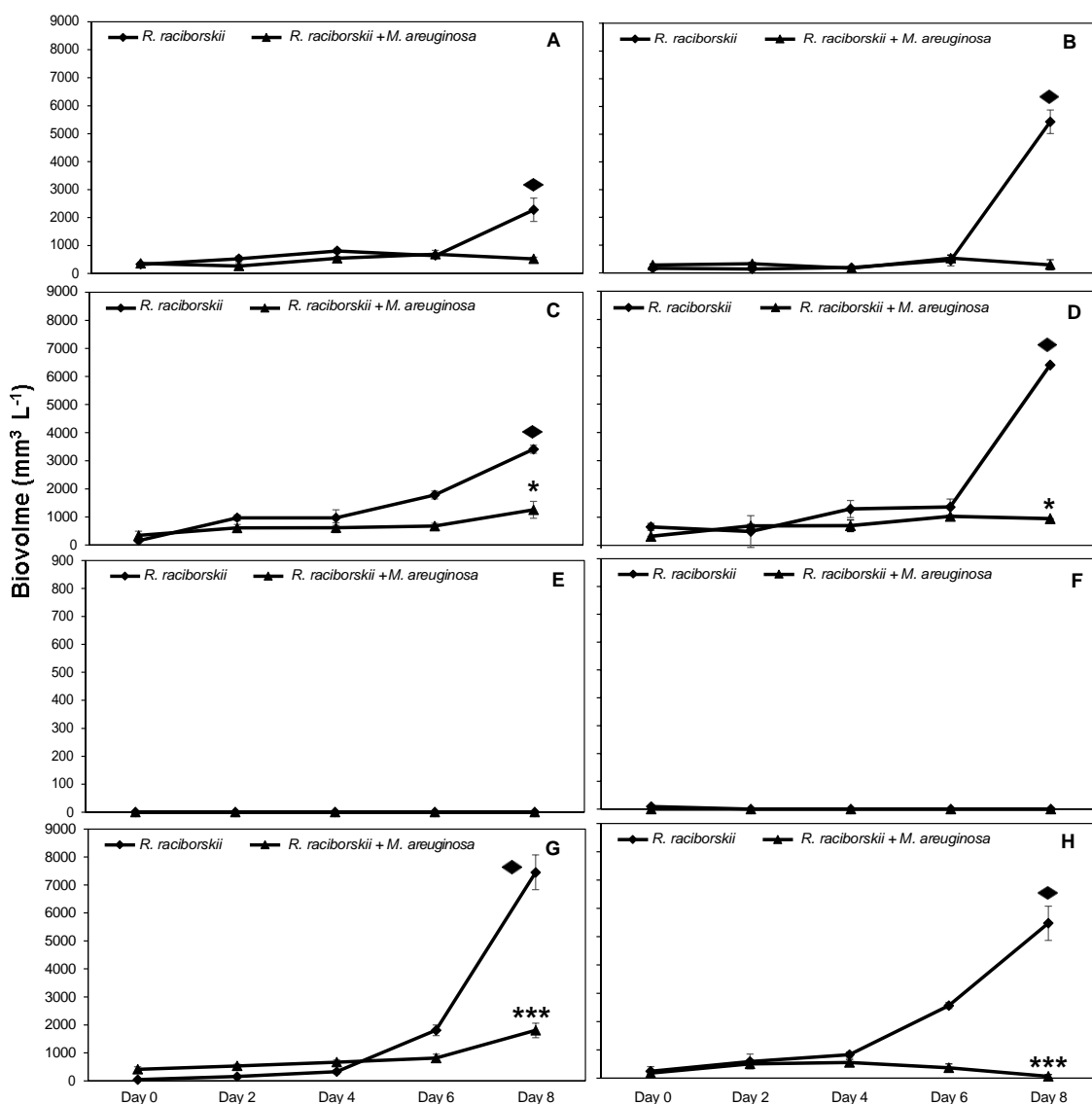


Figura 14: Mudanças no biovolume de *R. raciborskii* durante co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada. A= controle na temperatura 24°C, B= controle na temperatura 30°C, C= nitrato na temperatura 24°C, D= nitrato na temperatura 30°C, E= uréia na temperatura 24°C, F= uréia na temperatura 30°C, G= fosfato na temperatura 24°C, H= fosfato na temperatura 30°C.*= Diferença significativa entre Nitrato e Controle; **= Diferença significativa entre Ureia e Controle; ***= Diferença significativa entre Fosfato e Controle; ◆ Diferença significativa de biovolume de *R. raciborskii* em monocultura e durante a co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada.

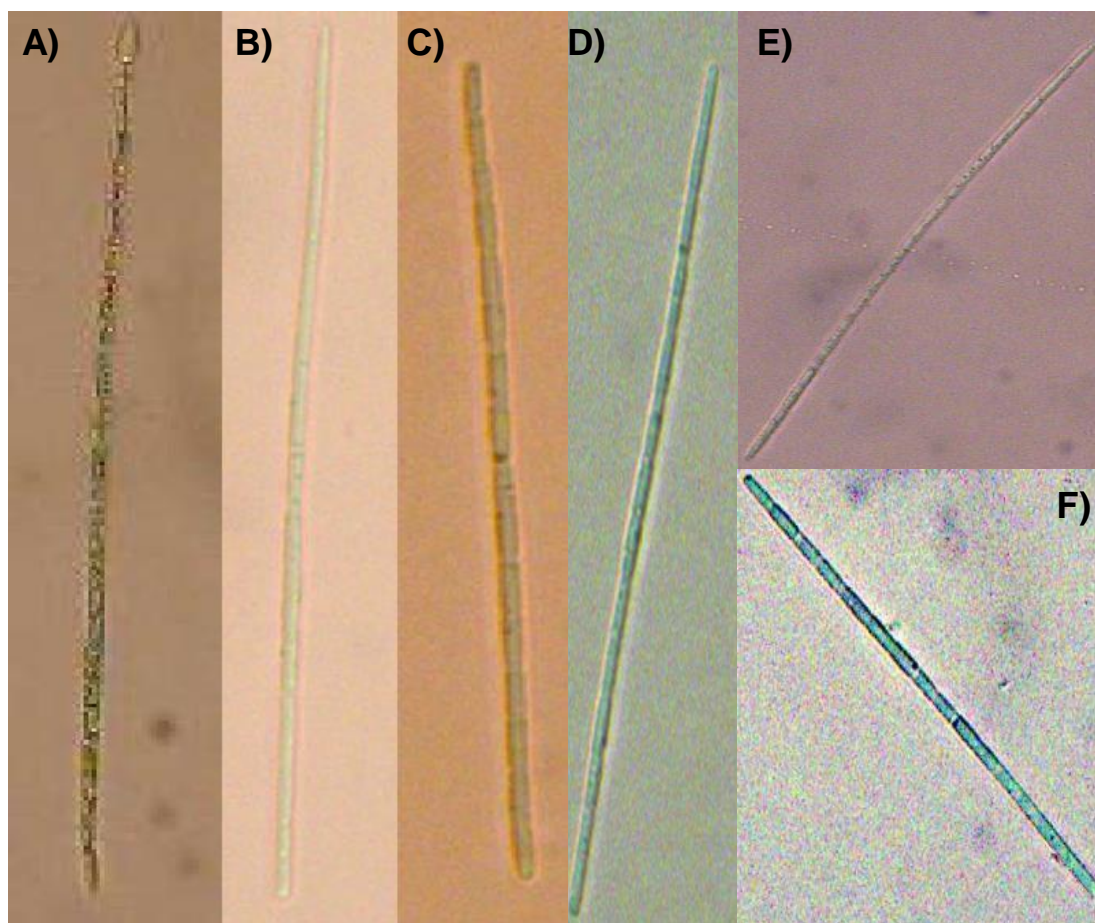


Figura 15. Alteração morfológica na cepa de *R. raciborskii* durante a co-cultivação com *M. aeruginosa* em câmara particionada. A) Monocultura de *R. raciborskii* em 24°C; B) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular e presença de vesículas em co-cultivo na condição nitrato 24°C; C) *R. raciborskii* com divisão de células espaçadas na condição controle 24°C; D) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição fosfato 24°C; E) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição nitrato 30°C; F) *R. raciborskii* sem a presença de divisão celular na condição fosfato 30°C.

Os resultados da ANOVA mostraram significativos para as relações dias, nutrientes, temperaturas e tratamentos sobre as taxas de crescimento específico das duas espécies (Tabelas 6 e 7). As maiores taxas de crescimento de *M. aeruginosa* ocorreu em 24°C principalmente nas condições nitrato e controle (Figura 16). *R. raciborskii* apresentou maior taxa de crescimento específico na temperatura de 30°C, principalmente nas condições nutricionais de nitrato e fosfato (Figura 16).

As taxas de inibição/estimulo mostraram que *R. raciborskii* inibiu significativamente ($p < 0.01$) o crescimento de *M. aeruginosa*, sendo mais fortemente na temperatura de 24°C, em 30°C ocorreu a estimulação do crescimento na condição controle no primeiro dia de incubação. Com relação a inibição do crescimento da espécie *R. raciborskii*, observamos uma inibição mais fraca nas duas temperaturas testadas. Em 24°C ocorreu estimulação do crescimento de *R. raciborskii*, especialmente sob condição de fosfato, já na temperatura de 30°C a estimulação foi menor, sendo registrada a estimulação do crescimento na condição nutricional controle nos dias 0, 2 e 6 (Figura 17).

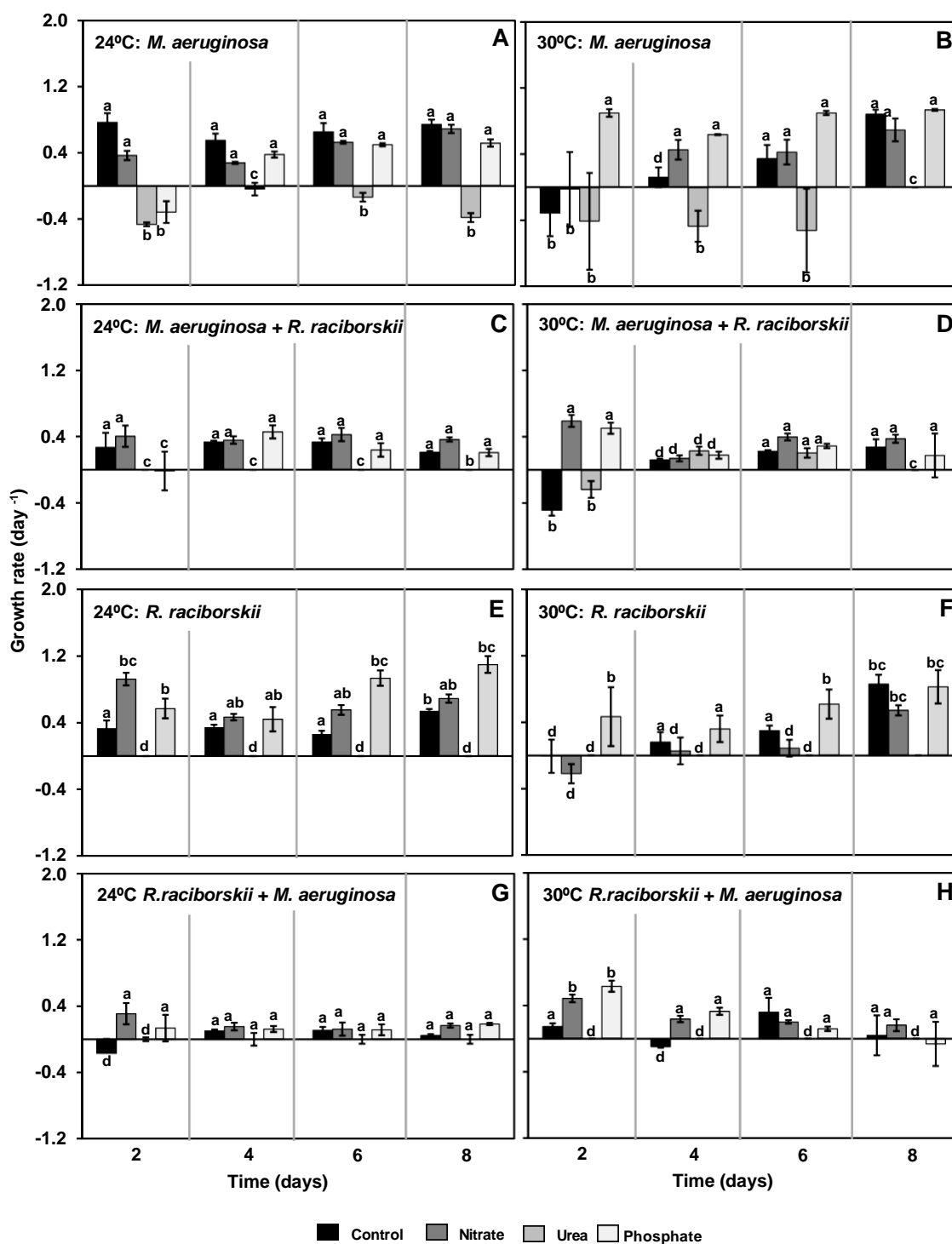


Figura 16. Taxa de crescimento específico de co-cultura em câmara compartilhada. A= *M. aeruginosa* em 24°C, B= *M. aeruginosa* em 30°C, C= *M. aeruginosa* + *R. raciborskii* em 24°C, D= *M. aeruginosa* + *R. raciborskii* em 30°C, E= *R. raciborskii* em 24°C, F= *R. raciborskii* em 30°C, G= *R. raciborskii* + *M. aeruginosa* 24°C, H= *R. raciborskii* + *M. aeruginosa* 24°C. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente p<0.05.

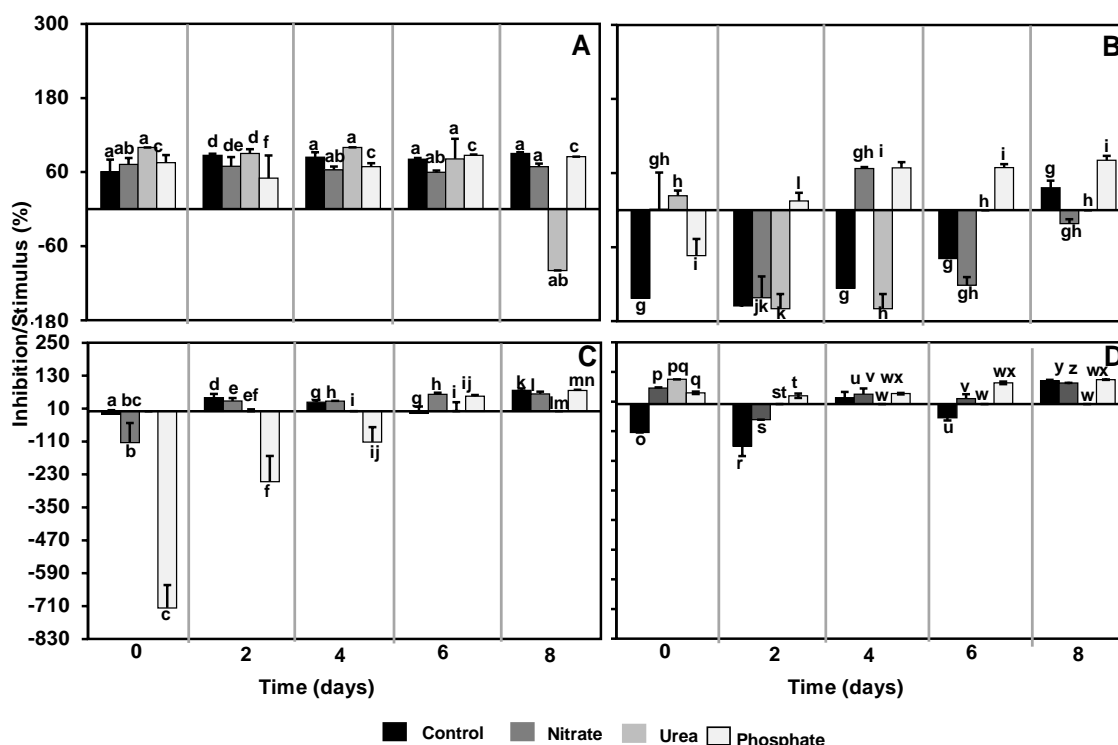


Figura 17. Taxa de inibição/estímulo de crescimento em co-cultivação em câmara particionada. *M. aeruginosa* em 24° (A); *M. aeruginosa* em 30° (B); *R. raciborskii* em 24°C (C); *R. raciborskii* 30°C. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

Os fatores dias, nutrientes, temperaturas e tratamentos atuam significativamente ($p < 0.05$) nas concentrações de saxitoxinas e microcistinas (Tabela 6 e 7). Durante a co-cultivação as concentrações de saxitoxinas na temperatura de 24°C apresentaram uma redução significativa em relação as concentrações encontradas em monocultura de *R. raciborskii*, sendo os maiores valores (1.33 $\mu\text{g/L}$) encontrados em nitrato dia 2. Em contrapartida, em 30°C foi verificado maior na síntese de saxitoxina por *R. raciborskii* com os maiores valores encontrados em controle (5.28 $\mu\text{g/L}$) no dia 0 (Figura 18). Com relação as concentrações de microcistinas, foi observado que os experimentos em co-cultivo apresentaram concentrações mais elevada do que em monocultura. Os maiores valores verificados na temperatura 24°C ocorreram nas condições controle e nitrato (0.77 $\mu\text{g/L}$) no dia 4. A temperatura elevou as concentrações de microcistinas nos experimentos

de monocultura 30° C, com os maiores valores em controle e nitrato (0.04 µg/L), já nos experimentos em câmaras particionadas as maiores concentrações (1.26 µg/L) foram encontradas em nitrato no dia 2, entretanto a temperatura não teve influência significativa sobre concentrações de microcistinas (Figura 19).

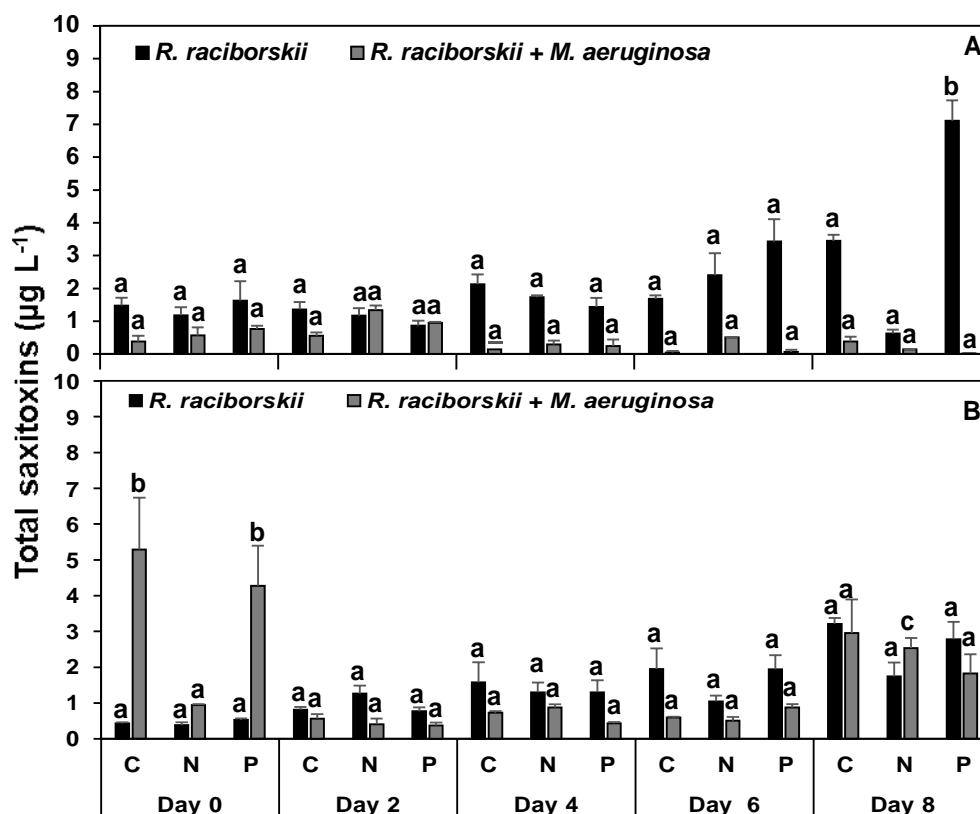


Figura 18. Concentrações de saxitoxina por tempo nos tratamentos de monocultura de *R. raciborskii*, durante co-cultivação de *R. raciborskii* em câmara particionada com *M. aeruginosa*. 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente p<0.05.

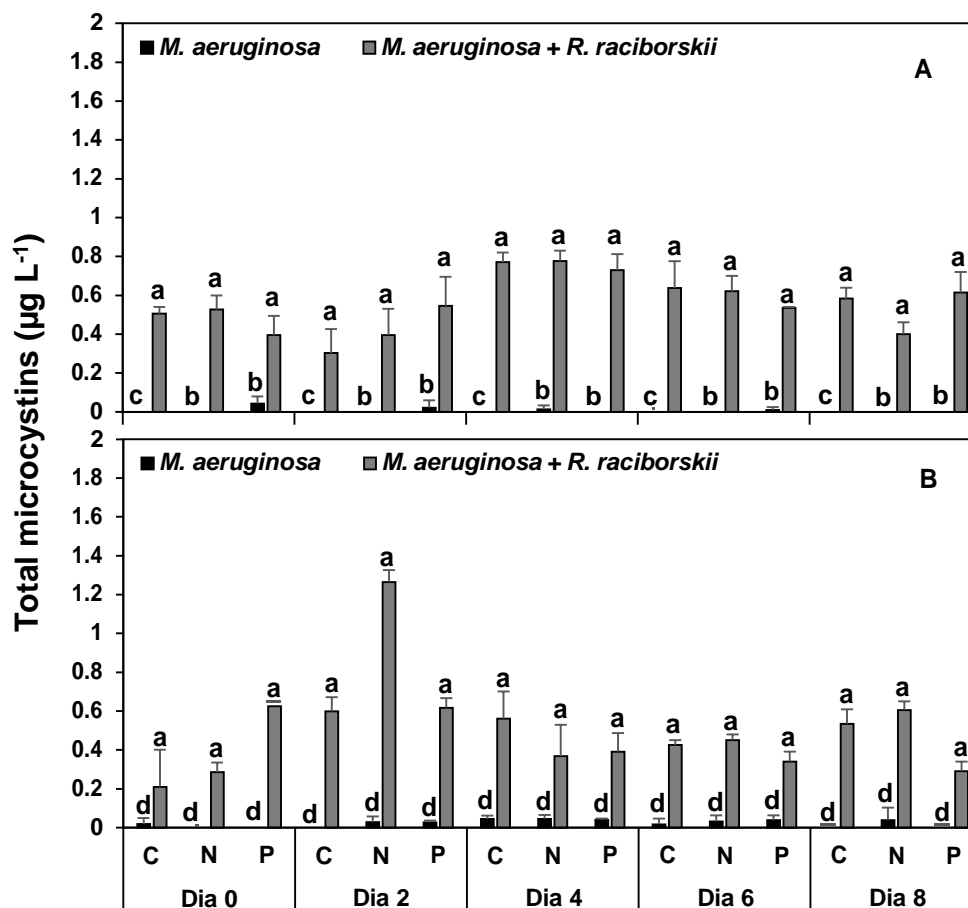


Figura 19. Concentrações de microcistina por tempo nos tratamentos de monocultura de *M. aeruginosa*, durante co-cultivação de *M. aeruginosa* em câmara particionada com *R. raciborskii*. 24°C (A); 30°C (B). C= controle, N= nitrato, P= fosfato. Médias com diferentes letras alfabéticas são diferentes significativamente $p < 0.05$.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o aumento das concentrações dos nutrientes fosfato e nitrato e temperatura promoveram maior crescimento das cianobactérias e produção de toxinas confirmando nossa primeira hipótese. Em todos os experimentos *R. raciborskii* dominou sobre *M. aeruginosa*, entretanto, o aumento da temperatura favoreceu o biovolume celular de *R. raciborskii* e influenciou os efeitos da competição, reduzindo significativamente o biovolume celular de *M. aeruginosa*. A elevação da temperatura também mostrou ter efeito significativo nas concentrações de cianotoxinas, uma vez que nos tratamentos de monocultura a microcistina aumentou em temperatura elevada, já a saxitoxina teve sua concentração reduzida. Durante a competição, a temperatura não teve influência significativa sobre as concentrações de microcistinas, por

outro lado, a síntese de saxitoxina foi significativamente maior em temperatura elevada. Estes resultados corroboram com a nossa primeira hipótese, indicando que os efeitos da elevação da temperatura poderão influenciar o aumento das concentrações de toxinas. Semelhantes aos resultados encontrados neste estudo, trabalhos indicam que o aumento da temperatura e nutrientes têm favorecido o crescimento das cianobactérias, alterando as taxas de crescimento (positiva) entre espécies, e intensificado a produção de toxinas (PAERL e PAUL 2012; THOMAS e LITCHEMAM 2016).

4.1 Biovolume e efeitos alelopáticos das cianobactérias

Em todas os experimentos, *M. aeruginosa* mostrou maior crescimento em 24°C sob condições de nitrato, enquanto que *R. raciborskii* mostrou maior biovolume sob condições nutricionais de fosfato, sendo os experimentos de cultura mista e meio livre de células sob temperatura de 30°C, e os experimentos de monocultura e co-cultura com maior biovolume em 24°C. O crescimento de *M. aeruginosa* tem sido relacionada positivamente com temperaturas máximas de até 28°C (MANTZOUKII et al., 2016), entretanto, evidências sugerem que esta espécie não pode se beneficiar em temperaturas mais elevadas (LÜRLING et al., 2013). Apesar de alguns estudos sugerirem que florações de *M. aeruginosa* possam ser favorecidas por efeitos indiretos do aquecimento global, resultantes de suas características ecofisiológicas como a capacidade de flutuação e formação de colônias, conferindo maior acesso a luz, defesas fisiológicas e redução da herbivoria (PAERL e HUISMAN, 2009; LEI; PENG; HAN, 2015), nossos resultados sugerem que a baixa tolerância a temperaturas mais elevadas de *M. aeruginosa* pode facilitar a substituição desta espécie por espécies como a *R. raciborskii* mais tolerante a águas mais quentes.

As interações alelopáticas entre as cepas de cianobactérias mostraram a inibição do crescimento e da produção de toxinas por ambas as espécies, no entanto, a *R. raciborskii* mostrou produzir maior efeito alelopático sobre *M. aeruginosa* e sua produção de microcistina, o que provavelmente foi ocasionado pelos metabólitos secundários liberados por *R. raciborskii*, promovendo sua dominância nas diferentes condições nutricionais e temperaturas testadas, corroborando com a segunda hipótese deste estudo. O aumento do biovolume de *R. raciborskii* e a redução do crescimento de *M. aeruginosa* em alta temperatura pode ser explicado por temperaturas mais elevadas induzirem maior

atividade alelopática em *R. raciborskii* (ANTUNES; LEÃO; VASCONCELLOS, 2012). Outro fator importante está relacionado a capacidade de cepas de *R. raciborskii* tolerar uma ampla faixa de temperaturas, com crescimento ótimo entre 19 a 32°C (BRIAND et al., 2014). Cepas de *R. raciborskii* possuem uma alta afinidade com fósforo (BURFORD et al., 2018), além disso, alterações simultâneas nas concentrações de nutrientes e temperaturas afetam o crescimento mais severamente do que mudanças de um único fator (GALVANESE; PADIAL; AUBRIOT, 2019).

Raphidiopsis raciborskii foi sugerida como uma espécie alelopática (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007). Exsudatos de *R. raciborskii* e filtrados livres de células da água de um lago durante uma floração mostraram efeitos alelopáticos na maioria das espécies expostas, entre elas *M. aeruginosa* (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007). Acredita-se, que as substâncias alelopáticas produzidos por *R. raciborskii* desempenham importante papel na competição por recursos e na sua aptidão invasiva (LEÃO et al., 2009). Nossos resultados são condizentes com outros estudos os quais observaram a inibição de *M. aeruginosa* por *R. raciborskii* sob diferentes condições de estresses ambientais (MELLO et al., 2012; MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013; RZYMSKI et al., 2014; BRITO; DUARTE-NETO; MOLICA, 2018). Em contrapartida, um estudo revelou que ao contrário de cepas tóxicas, cepas não tóxicas de *M. aeruginosa* apresentaram crescimento comparáveis a *R. raciborskii* em diferentes temperaturas, sugerindo a existência de *trade-off* entre produção de toxinas e taxas de crescimento em altas faixas de temperatura em *M. aeruginosa* (THOMAS e LITCHEMAM, 2016).

A exposição de *R. raciborskii* a *M. aeruginosa* promoveu o crescimento da espécie nos dias iniciais de incubação, o que pode indicar que *R. raciborskii* teve uma resposta positiva aos metabólitos alelopáticos de *M. aeruginosa*, entretanto, a inibição do crescimento nos últimos dias de incubação pode ter sido resultante dos danos causados por processos de estresses oxidativos nos aparelhos fotossintéticos de *R. raciborskii*, como demonstrado nos trabalhos de Suknik et al., (2002), Pflugmacher (2002) e Zhou et al., (2006).

A produção de compostos alelopáticos podem depender das condições ambientais, fases de crescimento, e exposição a limitações por recursos (MARINHO; SOUZA; LÜRLING, 2013). Em condições de estresses ambientais, substâncias alelopáticas podem reduzir a competição por recursos e levar a exclusão de espécies, assim como pode compensar a desvantagem competitiva, favorecendo a permanência da espécie produtora (LEFLAIVE e TEM-HAGE, 2007; CHIA et al., 2016). Não consideramos as respostas

alelopáticas ocorridas em nosso estudo como resultantes da competição por recursos, tendo em vista que não houve limitação de recursos, e a competição por recursos só é possível quando um recurso é limitado, como mostrado por Marinho; Souza; Lürling, (2013).

O menor biovolume de *R. raciborskii* no experimento com o meio livre de células na temperatura de 30°C coincidiu com a redução do volume celular nesta temperatura, indicando que o aumento da temperatura reduziu o biovolume celular desta espécie. Estudos mostraram que o aumento da temperatura reduziu o biovolume celular de *R. raciborskii* sobre uma mesma intensidade de luz, sugerindo que este efeito é ocasionado por temperaturas mais elevadas (REYNOLDS, 1997; XIÃO; WILLIS; BURFORD, 2017). A relação menor volume celular em temperaturas mais elevadas também foi verificada em estudo realizado por Xião, Willis e Burford (2017), sugerindo que em temperaturas mais elevadas a relação volume versus densidade celular pode alternar para garantir maior crescimento populacional. Além disso, a seleção por tamanhos de células menores pode promover maior área superficial de absorção, facilitar a formação de vesículas de gás e flutuação em condições de estratificação formada em temperaturas elevadas, este efeito vem sendo observado em células de diatomáceas em resposta a elevação da temperatura da água (WINDER; REUTER; SHLADOW, 2009).

A característica de células longas e septos transversais poucos constrictos ou não visíveis em tricomas de *R. raciborskii* é característico dos processos iniciais de divisão celular (SING, 1962). Além disso, alterações morfológicas como a presença de vesículas distribuídas no filamento podem ser resultantes da formação de vesículas extracelulares, as quais têm sido associadas a processos biológicos como a comunicação celular e defesa celular e/ou autodefesa (MASHBUR-WAREN et al., 2008; RIVERA et al., 2010; MANNIG e KUEH, 2011). O processo de vesiculação vem sendo considerado como um fenômeno comum para a espécie *R. raciborskii* durante seu crescimento, aumentando sob condições de estresses ambientais e durante interações com um potente concorrente (ZARATONELO et al., 2018). Provavelmente, as alterações morfológicas em *R. raciborskii* durante a co-cultivação foi consequente do estresse ocasionado pela competição com *M. aeruginosa*. Durante experimento em laboratório, com a co-cultivação de *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*, foi observado a formação de vesículas extracelulares em *R. raciborskii* (ZARATONELO et al., 2018), mostrando que sobre condições de estresses ambientais e competição, *R. raciborskii* pode utilizar este mecanismo para sobreviver e manter sua população viva.

As taxas de crescimento podem medir a competição entre espécies sobre diferentes condições ambientais (THOMAS e LITCHEMAM, 2016). Nem todas as cianobactérias conseguem sobreviver em condições de limitação de nitrato em meio com uréia. Neste estudo verificamos que *M. aeruginosa* apresentou maior tolerância a limitação de nitrato, na presença de uréia como fonte de nitrogênio, sobrevivendo por um maior tempo de exposição. *R. raciborskii* sobreviveu apenas no dia que foi incubada em experimento com 30°C. O baixo crescimento celular de *R. raciborskii* no meio com uréia foi acompanhado pela presença de heterócitos em alguns tricomas, branqueamento celular, seguido por morte celular. Apesar de não termos dados sobre isso, o branqueamento celular em *R. raciborskii* ocorre pelo aumento de peróxidos intracelulares, induzidos pela limitação de nitrogênio (SAKAMOTO; DELGAIZO; BRYANT, 1998; STUCKEN et al., 2014). Semelhante aos nossos resultados, Sakamoto et al., (1998), observaram a morte celular de cianobactéria cultivada com uréia como fonte de nitrogênio, a perda de toda pigmentação em 18 horas de incubação foi associada ao estresse oxidativo. Entretanto, ressaltamos que o baixo crescimento das cianobactérias no meio com uréia como fonte de nitrogênio, pode ter ocorrido também em resposta a elevada concentração de uréia no meio.

4.2 Produção de toxinas

Os possíveis efeitos sinérgicos das alterações climáticas e do enriquecimento de nutrientes nos corpos aquáticos sobre a expansão e toxicidade das cianobactérias vêm sendo amplamente discutido, e semelhante aos resultados encontrados neste estudo, sugerem que estas condições promoverão a expansão e toxicidade das cianobactérias em ecossistemas aquáticos (PAERL e PAUL, 2012; O'NEIL et al., 2012; CAREY et al., 2012). Neste trabalho verificamos que a maior síntese de microcistina produzida por *M. aeruginosa* ocorreu em temperatura mais elevada, este resultado corrobora com a hipótese de que elevadas temperaturas podem conferir vantagens competitivas a espécies produtoras de toxinas nos ecossistemas aquáticos (GANTAR, 2008; DUNKER; JAKOB; WILHLM, 2013; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2016).

Sabe-se que temperaturas elevadas promovem maior toxicidade das cianobactérias, estimulando a biossíntese das toxinas, no entanto, ainda não está claro se o efeito sinérgico do aumento da temperatura e nutrientes nas florações tóxicas ocasionam o aumento simultâneo da toxicidade das florações (EL-SHEHAWY et al., 2012). No presente

trabalho verificamos que as interações entre os nutrientes, temperaturas e tratamentos foram significativas para a variação nas concentrações de microcistinas e saxitoxinas. Observamos que as maiores concentrações de microcistinas ocorreram nos experimentos de competição em cultura mista e co-cultura, em que o fator temperatura de forma isolada não apresentou influência, por outro lado, as maiores concentrações em monocultura ocorreram durante a exposição a temperatura em 30°C e altos níveis de nitrato. Estudos anteriores registraram maior crescimento de *M. aeruginosa* sobre condições de nitrato (CHIA et al., 2016), este nutriente é um elemento chave para o metabolismo dos organismos fotossintetizantes e pode estimular maior síntese de toxinas ricas em nitrogênio, como a microcistina (VAN DE WALL et al., 2014). Elevados níveis de nitrogênio favorecem cepas tóxicas produtoras de microcistinas, promovendo maior produção de toxinas em cianobactérias não fixadoras de nitrogênio (DAVIS et al., 2010; GLOBER et al., 2016). O aumento das concentrações de microcistinas é considerado como uma estratégia adaptativa de *M. aeruginosa* para aumentar seu crescimento durante a exposição de extratos de a *R. raciborskii* (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2016), entretanto, verificamos que as concentrações de microcistinas foram inibidas quando exposta a meio livre de células de *R. raciborskii*. A temperatura não tem sido estreitamente relacionada com o crescimento populacional e produção de toxinas em *Microcystis* (PINEDA-MENDOZA; ZÚNIGA, MARTÍNEZ-JERÓNIMO 2016), por outro lado, experimentos com *M. aeruginosa* mostraram que temperaturas elevadas e concentrações de fosfato promoveram maior teor de microcistinas (DAVIS et al., 2009). As maiores concentrações de saxitoxinas produzidas pelas monoculturas de *R. raciborskii* ocorreram em elevados níveis de fosfato para as duas temperaturas testadas. A interação entre a disponibilidade de fósforo e quotas de toxinas no crescimento populacional de *R. raciborskii* foi relatada por Burford et al., (2018). O aumento da produção de saxitoxinas em elevadas concentrações de fosfato diferem de resultados encontrados por Chislock, Sharp e Wilson, (2014). O maior biovolume celular e conteúdo de saxitoxina produzida por *R. raciborskii* no meio livre de células de *M. aeruginosa* foram encontrados em altas concentrações de fosfato, entretanto, a redução do volume celular e menor síntese de saxitoxina durante a exposição a 30°C sugere um possível *trade-off*, em que o aumento do número de células compensou o maior volume celular e produção de saxitoxina. Maiores concentrações de saxitoxinas também estiveram associadas a taxa de crescimento específico, indicando que o aumento do crescimento específico desta espécie promove a produção de saxitoxina (BITTENCOURT-

OLIVEIRA et al., 2016). A inibição de saxitoxina durante exposição de *R. raciborskii* a *M. aeruginosa* indica que a produção de microcistina é um mecanismo de defesa que confere vantagem competitiva ao seu produtor, desempenhando importante papel nos processos de sucessão ecológica (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2016).

A produção de saxitoxina por *R. raciborskii* em monocultura e durante a exposição ao meio livre de células de *M. aeruginosa* foi relacionada negativamente com o aumento da temperatura, indicando que temperaturas menores são mais adequadas para produção de toxinas em *R. raciborskii* (SAKER e GRIFFITHS, 2000). Semelhante aos nossos resultados, Mesquita et al., (2019) verificaram redução nas concentrações de saxitoxinas em cepas de *R. raciborskii* quando cultivadas em 30°C, sugerindo que possivelmente, em um cenário futuro de mudanças climáticas cepas de *R. raciborskii* se tornem menos tóxicas. Entretanto, de acordo com achados neste trabalho, ressaltamos que em condições de competição, como verificados nos experimentos de cultura mista e co-cultivo a produção de saxitoxina tenderá a aumentar em temperaturas elevadas como 30°C. Estes resultados são importantes, tendo em vista que o aumento da temperatura consequente das mudanças climáticas e a eutrofização das águas tendem a promover intensas florações de cianobactérias tóxicas como a *Raphidiopsis raciborskii*.

Nossos resultados reforçam a importância das toxinas como potenciais aleloquímicos, capazes de influenciar a competição, alternar a dominância de espécies garantindo vantagens competitivas a espécie melhor competidora, bem como, afetar negativamente a diversidade de espécies, reduzir a qualidade da água dos ecossistemas e comprometer os recursos ecossistêmicos. Neste sentido, adotar medidas de manejo no controle de florações de espécies de cianobactérias tóxicas são fundamentais para a obtenção da qualidade da água dos ecossistemas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que o efeito sinérgico dos nutrientes e temperaturas podem alterar o crescimento, interações alelopáticas e produção de toxinas de, *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Altos níveis de nitrato e fosfato mostraram influenciar fortemente o crescimento das espécies de cianobactérias, enquanto a uréia não foi ideal para o crescimento, como resultado da limitação de nitrogênio para o metabolismo das espécies. *R. raciborskii* apresentou maior inibição sobre as cepas de *M. aeruginosa* e estas interações foram intensificadas com o aumento da temperatura. Alterações morfológicas resultantes da divisão celular e formação de vesículas extracelulares em *R. raciborskii* podem ocorrer em respostas aos estresses ocasionados durante competição com *M. aeruginosa*. As toxinas produzidas por ambas as espécies mostraram serem potentes aleloquímicos capazes de influenciar a competição entre *R. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Os conteúdos de microcistinas e saxitoxinas apresentaram respostas opostas com relação ao aumento da temperatura, enquanto a produção de microcistina foi aumentada, saxitoxina apresentou concentrações menores em temperaturas elevadas, sugerindo que temperaturas elevadas possam tornar cepas de *R. raciborskii* menos tóxicas, exceto durante a competição, onde a produção de saxitoxina pode não ser fortemente inibida. Estes resultados indicam que o aumento da temperaturas e nutrientes (nitrato e fósforo) nos ecossistemas levará a dominância de *R. raciborskii* sobre *M. aeruginosa*, enquanto que sob altas concentrações de uréia estas espécies sofreram forte limitação de crescimento.

6. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, J. T.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* strain LEGE 99043. **Microbial ecology**, v. 64, n. 3, p. 584-592. 2012.
- BABICA, P.; KOHOUTEK, J.; BLÁHA, L.; ADAMOVSKÝ, O.; MARŠÁLEK, B.
Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR,-RR and-YR in freshwater sediments with different organic material contents. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 385 (8), 1545-1551. 2006.
- BÁRTOVÁ, K.; HILSCHEHOVÁ, K.; BABICA, P.; MARŠÁLEK, B.; BLÁHA, L. Effects of microcystin and complex cyanobacterial samples on the growth and oxidative stress parameters in green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and comparison with the model oxidative stressor—herbicide paraquat. **Environmental toxicology**, 26(6), 641-648. 2011.
- BLÁHOVÁ, L.; ORAVEC, M.; MARŠÁLEK, B.; ŠEJNOHOVÁ, L.; ŠIMEK, Z.;
BLÁHA, L. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. **Toxicon**, 53 (5), 519-524. 2009.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. C.; CHIA, M. A.; CAMARGO-SANTOS, D.;
- DIAS, C. T. The effect of saxitoxin and non-saxitoxin extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on cyanobacteria and green microalgae. **Journal of applied phycology**, 28 (1), 241-250. 2016.
- BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA M.; FABRE A.; HUSZAR V. L.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK J.; KRUK C.
What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? **FEMS Microbiol. Ecol.** 79, 594-607. 2012.
- BURFORD, M. A.; BEARDALL, J.; WILLIS, A.; ORR, PT; MAGALHÃES, VF.; RANGEL, LM.; NEILAN, BA. Compreendendo as estratégias vencedoras utilizadas pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, formadora de flores. **Algas nocivas**, 54, 44-53. 2016.

- BURFORD, M. A.; WILLIS, A.; CHUANG, A.; MAN, X.; ORR, P. T. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of Oceanology and Limnology**, 36 (4), 1032-1039. 2018.
- BRITO, M. T. D. S; DUARTE-NETO, P. J.; MOLICA, R. J. R. *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* competing under different conditions of pH and inorganic carbon. **Hydrobiologia**, 815 (1), 253-266. 2018.
- CHIA, M. A.; JANKOWIAK, J. G.; KRAMER, B. J.; GOLESKI, J. A.; HUANG, I. S.; ZIMBA, P. V.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; GOBLER, C. J. Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena (Dolichospermum)* blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. **Harmful algae**, 74, 67-77. 2018.
- CHIA, M. A.; KRAMER, B. J.; JANKOWIAK, J. G.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. D. C.; GOBLER, C. J. The Individual and Combined Effects of the Cyanotoxins, Anatoxin-a and Microcystin-LR, on the Growth, Toxin Production, and Nitrogen Fixation of Prokaryotic and Eukaryotic Algae. **Toxins**, 11(1), 43. 2019.
- CHISLOCK, M. F.; SHARP, K. L.; WILSON, A. E. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. **Water Research**, 49, 207-214. 2014.
- DAVIS, T. W.; BERRY, D. L.; BOYER, G. L.; 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**, 8 (5), 715-725. 2009.
- DZIALLAS, C.; GROSSART, H.P. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. **PLoS One**, 6, 9, e25569. 2011.
- DUNKER, S.; JAKOB, T.; WILHELM, C. Contrasting effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and physiology of two green algae, *Oocystis marsonii* and *Scenedesmus obliquus*, revealed by flow cytometry. **Freshwater Biology**, v.58, p.1587-1587. 2013.
- EL-SHEHAWY, R.; GOROKHOVA, E.; FERNANDEZ-PINAS, F.; DEL CAMPO, F. F. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: what can we learn from experiments? **Water Research**, 46 (5), 1420-1429. 2012.

- FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? 1. **Journal of Phycology**, 43(2), 256-265. 2007.
- FIGUEREDO, C. C.; VON RÜCKERT, G.; CUPERTINO, A.; PONTES, M. A.;
- FERNANDES, L. A.; RIBEIRO, S. G.; MARAN, N. R. Lack of nitrogen as a causing agent of *Cylindrospermopsis raciborskii* intermittent blooms in a small tropical reservoir. **FEMS microbiology ecology**, 87(3), 557-567. 2014.
- GANTAR, M.; BERRY, J. P.; THOMAS, S.; WANG, M.; PEREZ, R.; REIN, K. S.
- Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **FEMS microbiology ecology**, 64 (1), 55-64. 2008.
- GALVANESE, E.; PADIAL, A. A.; AUBRIOT, L. A aclimação a altas temperaturas aumenta a capacidade de *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) de suportar a deficiência de fosfato e revela respostas distintas à tensão. **European Journal of Phycology**, 1-10. 2019.
- GER, K. A.; HANSSON, L. A.; LURLING. Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a mor eutrophic world. **Freshwater Biology**, 59, 1783-1798. 2014.
- GRANELI, EDNA; WEBER, MARTIN; SALOMON, PAULO S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. **Harmful algae**, 8 (1), 94-102. 2008.
- GRIFFITHS, D. J.; SAKER, M. L. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environ Toxicol**, 18, 78-93. 2003.
- HARKE, M.J.; GOBLER, C.J. Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. **PLOS ONE**, 8 (7), E69834. 2013.
- HARKE, M. J.; DAVIS, T. W.; WATSON, S. B.; GOBLER, C. J. Nutrient-controlled niche differentiation of western Lake Erie cyanobacterial populations revealed via metatranscriptomic surveys. **Environmental science & technology**, 50 (2), 604-615. 2015.

HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.; KÍRSCTEL, D.; POLLIGHER, U.; ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, 35, 403-424. 1999.

LEI, L.; LI, C.; PENG, L.; HAN, B. P. Competition between toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* and its ecological implication. **Ecotoxicology**, 24 (7-8), 1411-1418. 2015.

LEÃO, Pedro N.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; VASCONCELOS, V. M. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. **European Journal of Phycology**, 44 (3), 347-355. 2009.

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

LÜRLING, M.; ESHETU, F.; FAASSEN, E. J.; KOSTEN, S.; HUSZAR, V. L. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. **Freshwater Biology**, 58 (3), 552-559. 2013.

MARINHO, M. M.; SOUZA, M. B. G.; LÜRLING, M. Light and phosphate competição between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* is strain dependente. **Microbiology of Aquatic systems**. 2013.

MANTZOUKI, E.; VISSER, P. M.; BORMANS, M.; IBELINGS, B. W. Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. **Aquatic Ecology**, 50 (3), 333-350. 2016.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. **BMC Microbiology**, 11 (1), 258, 2011.

MASHBURN-WARREN, L.; HOWE, J.; GARIDEL, P.; RICHTER, W.; STEINIGER, F.; ROESSLE, M.; WHITELEY, M. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. **Molecular microbiology**, 69(2), 491-502, 2008.

MELLO, M. M. E., SOARES, M. C. S., ROLAND, F.; LÜRLING, M. (2012). Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced

by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of plankton research**, 34 (11), 987-994. 2012.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, 59, 303-327. 2013.

MESQUITA, M. C.; LÜRLING, M.; DORR, F.; PINTO, E.; MARINHO, M. M. Combined Effect of Light and Temperature on the Production of Saxitoxins in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains. **Toxins**, 11(1), 38, 2019.

MIOTTO, M C.; COSTA, L D F.; BRENTANO, D M, NADER, C.; DOS SANTOS SOUZA, L.; GRESSLER, P. D.; RÖRIG, L. R. Caracterização ecofisiológica e perfil de toxinas de duas linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas de uma lagoa subtropical no sul do Brasil. **Hydrobiologia**, 802 (1), 97-113. 2017.

MOWE, MA.; MITROVIC, SM.; LIM, RP.; FUREY, A.; E YEO, DC. Florescência tropical de cianobactérias: uma revisão da prevalência, taxa de problemas, toxinas e fatores ambientais influentes. **Jornal de Limnologia**, 74 (2). 2015.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A; GLOBER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, 14, 313-334. 2012.

PAERL, H. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In: **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. Springer, New York, NY, 217-237. 2008.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology**, 27-37. 2009.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water research**, 46, 1349-1363. 2012.

PANOU, M.; ZERVOU, S. K.; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; GKELIS, S. A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: Missing link in tropic invader's phylogeography tale. **Harmful algae**, 80, 96-106. 2018.

PASSARGE, J.; HOL, S.; ESCHER, M.; HUISMAN, J. Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? **Ecological Monographs**, 76 (1), 57-72. 2006.

PINEDA-MENDOZA, R. M.; ZÚÑIGA, G.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Microcystin production in *Microcystis aeruginosa*: strain type effect, environmental factors, nutrient concentrations and N: P ratio on mcyA gene expression. **Ecologia acuática**, 50 (1), 103-119. 2016.

PINHEIRO, C.; AZEVEDO, J.; CAMPOS, A.; LOUREIRO, S.; VASCONCELOS, V. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. **Hydrobiologia**, 705 (1), 27-42. 2013.

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

PHAM, T. L.; DAO, T. S.; TRAN, N. D.; NIMPTSCH, J.; WIEGAND, C.; MOTOO, U. Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng Reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam. In **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**, 53, 89-100. 2017.

RECKNAGEL, F.; ORR, P.T.; CAO, H. Inductive reasoning and forecasting of population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* in three sub-tropical reservoirs by evolutionary computation. **Harmful Algae**, 31, 26-34. 2014.

REYNOLDS, C. S. **Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory**. Oldendorf: Ecology Institute. 1997.

REYNOLDS, C. S. **The ecology of phytoplankton**. Cambridge University Press. 2006.

RIOS, J. F.; LEAL, C. R.; JANAINA, R.; RETZ, C. L.. Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains. **Annals of microbiology**, 66 (3), 1265-1276. 2016.

RZYMSKI, P.; PONIEDZIAŁEK, B.; KOKOCIŃSKI, M.; JURCZAK, T.; LIPSKI, D.; WIKTOROWICZ, K. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, 35, 1-8. 2014.

SAKAMOTO, T.; BRYANT, D. A. Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Arch Microbiol**, 169, 10-19. 1998.

SAKAMOTO, T.; DELGAIZO, V. B.; BRYANT, D. A. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64 (7), 2361-2366. 1998.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, 39 (4), 349-354. 2000.

SONG, H.; LAVOIE, M.; FAN, X.; TAN, H.; LIU, G.; XU, P; QIAN, H. Allelopathic interactions of linoleic acid and nitric oxide increase the competitive ability of *Microcystis aeruginosa*. **The ISME journal**, 11(8), 1865. 2017.

SUKENIK, A.; ESHKOL, R.; LIVNE, A.; HADAS, O.; ROM, M.; TCHERNOV, D.; KAPLAN, A. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp.(cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. **Limnology and Oceanography**, 47(6), 1656-1663, 2002.

STUCKEN, K.; JOHN, U.; CEMBELLA, A.; SOTO-LIEBE, K.; VÁSQUEZ, M. Impact of nitrogen sources on gene expression and toxin production in the diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and non-diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. **Toxins**, 6 (6), 1896-1915. 2014.

THOMAS, M. K.; LITCHMAN, E. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. **Hydrobiologia**, 763 (1), 357-369. 2016.

VAN DE WAAL, D. B.; SMITH, V. H.; DECLERCK, S. A.; STAM, E. C.; ELSER, J. J. Stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. **Ecology letters**, 17 (6), 736-742. 2014.

WALLS, J. T.; WYATT, K. H.; DOLL, J. C.; RUBENSTEIN, E. M.; ROBER, A. R. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, 610-611, 786-795. 2018.

WANG, Z.; LI, D.; CAO, X.; SONG, C.; ZHOU, Y. Photosynthesis regulates succession of toxic and nontoxic strains in blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria). **Phycologia**, 54 (6), 640-648. 2015.

WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. **In**. R.A. ANDERSEN, ed. Algal culturing techniques. Singapore: Academic Press/Phycological Society of America, 5, 269-285. 2005.

XIAO, M.; WILLIS, A.; BURFORD, M. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. **Harmful algae**, 62, 84-93. 2017.

YANG, B.; JIANG, Y.J.; HE, W.; LIU, W.X.; KONG, X. Z.; JØRGENSEN, S. E.; XU, F. L. The tempo-spatial variations of phytoplankton diversities and their correlation with trophic state levels in a large eutrophic Chinese lake. **Ecological Indicators**, 66, 153-162. 2016.

ZARANTONELLO, V. S.; NOYMA, T. P.; GAMALIER, N. P.; MELLO, J. P.; MARINHO, M. M.; MELO, R. C. The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF-01) responds to environmental stresses with increased vesiculation detected at single-cell resolution. **Frontiers in microbiology**, 9, 272, 2018.