



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

JEFFERSON VITOR MELO CABRAL

EFEITOS DA TEMPERATURA E NUTRIENTES NA INTERAÇÃO ALELOPÁTICA
DA MACRÓFITA SUBMERSA *Egeria densa* SOBRE A CIANOBACTÉRIA
POTENCIALMENTE TÓXICA *Raphidiopsis raciborskii*

CAMPINA GRANDE – PB
2023

JEFFERSON VITOR MELO CABRAL

**EFEITOS DA TEMPERATURA E NUTRIENTES NA INTERAÇÃO ALELOPÁTICA
DA MACRÓFITA SUBMERSA *Egeria densa* SOBRE A CIANOBACTÉRIA
POTENCIALMENTE TÓXICA *Raphidiopsis raciborskii***

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. José Etham de Lucena Barbosa

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana dos Santos Severiano

CAMPINA GRANDE – PB

2023

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.

C117e Cabral, Jefferson Vitor Melo.
Efeitos da temperatura e nutrientes na interação alelopática da macrófita submersa *Egeria densa* sobre a cianobactéria potencialmente tóxica *Raphidiopsis raciborskii* [manuscrito] / Jefferson Vitor Melo Cabral. - 2023.
45 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa ,
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa."

"Coorientação: Profa. Dra. Juliana dos Santos Severiano ,
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa"

1. Eutrofização. 2. Cianobactérias. 3. Ecologia aquática. I.

Título

21. ed. CDD 577.6

JEFFERSON VITOR MELO CABRAL

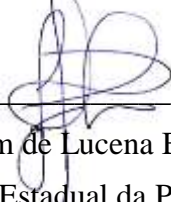
**EFEITOS DA TEMPERATURA E NUTRIENTES NA INTERAÇÃO ALELOPÁTICA
DA MACRÓFITA SUBMERSA *Egeria densa* SOBRE A CIANOBACTÉRIA
POTENCIALMENTE TÓXICA *Raphidiopsis raciborskii***

**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.**

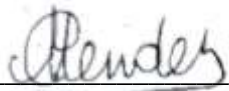
Área de concentração: Ecologia e
Conservação

Aprovado em: 28/02/2023

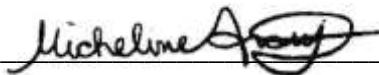
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Camila Ferreira Mendes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Micheline Kézia de Araújo
Instituto Natureza do Tocantins (NATURATINS)

AGRADECIMENTOS

À minha família minha família, minha mãe Suely Melo Lima, meu padrasto Petronio Vilela, meu irmão Diego Cabral e ao meu pai Euvaldo Cabral por todo amor, incentivo e apoio durante todo esse período que estive longe. Aos meu avós João Luiz de Lima (in memorian) e Maria Lindalva Melo de Lima. Todos meus tios, tias e primos.

Ao meu orientador Dr. José Etham de Lucena Barbosa por me acompanhar desde a graduação ao mestrado. Por todo ensinamento, apoio, incentivo e investimento na minha formação. Por me incentivar a ingressar no mestrado e seguir carreira científica.

À minha coorientadora Juliana dos Santos Severiano, por todo ensinamento e ter me acompanhado durante esse período.

Aos meus amigos Evaldo Farias, Juciliara Brito, Kézia Ribeiro, Ana Paula, Jacqueline e Lucas. Vocês são muito especiais para mim e pretendo levar nossa amizade por toda a vida.

Aos meus amigos e colegas do LEAq: Taty, Rany, Manu, Dayrla, Dayany, Gislayne, Dany, Patricia, Klisma, Beth. Sentirei saudades dos nossos dias juntos, ensinamentos e brincadeiras nas tardes do LEAq.

Ao professor André Pessanha, por todo ensinamento e carinho desde os primeiros anos de graduação.

A todos que contribuíram para a realização do meu experimento de mestrado.

À Universidade Estadual da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa.

Muito Obrigado!

RESUMO

A eutrofização artificial associada às mudanças climáticas pode intensificar as florações de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos. Esses microrganismos podem causar diversos impactos para ambientes aquáticos, alterando características físicas, químicas e biológicas e produzir toxinas letais para saúde humana e de outros animais. O nitrogênio e fósforo são os principais elementos que proporcionam o crescimento das cianobactérias, sendo elementos fundamentais para síntese de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, além de participar de outros processos metabólicos. *Raphiopsis raciborskii* é uma espécie de cianobactéria que tem ganhado ênfase em estudos por seu potencial invasivo e toxicidade, produzindo neurotoxinas (saxitoxina). Diante disso, métodos de biocontrole para florações de cianobactérias são essenciais e as macrófitas submersas são apontadas como organismos que controlam o crescimento e produção de toxinas de cianobactérias através da alelopatia. A macrófita submersa *Egeria densa* é apontada como potencial inibidora do crescimento de *R. raciborskii*. Porém o efeito dessa inibição em altas temperaturas e condições nutricionais ainda é desconhecido. O objetivo desse estudo foi analisar o potencial inibitório de *E. densa* sobre o crescimento e produção de toxinas de *R. raciborskii* em diferentes temperaturas e condições nutricionais. Foi utilizado tratamentos de interação de *R. raciborskii* com a biomassa (1gPF^{-1}) e extratos de *E. densa* sob temperaturas de 24, 28 e 32°C nas condições de excesso de nitrogênio (+N), excesso de fósforo (+P) e excessos de nitrogênio e fósforo (+NP). Foram medidos parâmetros de concentrações de clorofila-a, eficiência fotossintética e concentração de saxitoxinas. A partir dos dados de chl-a foram realizadas as taxas de crescimento e inibição. A presença física e extratos de *E. densa* foram capazes de inibir o crescimento e produção de biomassa da cianobactéria *R. raciborskii* em todas as temperaturas e concentrações de nutrientes testadas. Na temperatura de 24°C a biomassa de *E. densa* teve maior efeito negativo sobre a eficiência fotossintética de *R. raciborskii*, enquanto nas temperaturas de 28 e 32°C o extrato reduziu a eficiência fotossintética. Apesar da inibição do crescimento de *R. raciborskii*, as concentrações de saxitoxina foram altas na temperatura de 28°C, ultrapassando $5\mu\text{g L}^{-1}$ nos tratamentos em exposição à presença física e $1\mu\text{gL}^{-1}$ em exposição ao extrato. Apesar da macrófita submersa ter causado a inibição de *R. raciborskii* em todas as temperaturas e condições nutricionais, as maiores temperaturas favoreceram a produção e liberação de saxitoxinas pela cianobactéria.

Palavras-chave: alelopatia; eutrofização; cianotoxinas.

ABSTRACT

Artificial eutrophication associated with climate change may intensify cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems. These microorganisms can cause several impacts to aquatic environments, altering physical, chemical and biological characteristics and producing lethal toxins for human health and other animals. Nitrogen and phosphorus are the main elements that provide the growth of cyanobacteria, being fundamental elements for the synthesis of proteins, aminoacids and nucleic acids, in addition to participating in other metabolic processes. *Raphiopsis raciborskii* is a species of cyanobacteria that has gained emphasis in studies due to its invasive potential and toxicity, producing neurotoxins (saxitoxin). Therefore, biocontrol methods for cyanobacterial blooms are essential and submerged macrophytes are identified as organisms that control the growth and production of cyanobacterial toxins through allelopathy. The submerged macrophyte *Egeria densa* is identified as a potential inhibitor of the growth of *R. raciborskii*. However, the effect of this inhibition at high temperatures and nutritional conditions is still unknown. The aim of this study was to analyze the inhibitory potential of *E. densa* on the growth and toxin production of *R. raciborskii* at different temperatures and nutritional conditions. Interaction treatments of *R. raciborskii* with biomass (1gPF^{-1}) and extracts of *E. densa* were used at temperatures of 24, 28 and 32°C in the conditions of excess nitrogen (+N), excess phosphorus (+P) and excesses of nitrogen and phosphorus (+NP). Parameters of chlorophyll-a concentrations, photosynthetic efficiency and saxitoxin concentration were measured. From the chl-a data, growth and inhibition rates were performed. The physical presence and extracts of *E. densa* were able to inhibit the growth and biomass production of the cyanobacteria *R. raciborskii* at all temperatures and nutrient concentrations tested. At the temperature of 24°C, the biomass of *E. densa* had a greater negative effect on the photosynthetic efficiency of *R. raciborskii*, while at the temperatures of 28 and 32°C, the extract reduced the photosynthetic efficiency. Despite the inhibition of *R. raciborskii* growth, saxitoxin concentrations were high at 28°C, exceeding $5\mu\text{g L}^{-1}$ in treatments exposed to physical presence and $1\mu\text{gL}^{-1}$ in exposure to the extract. Although the submerged macrophyte caused the inhibition of *R. raciborskii* in all temperatures and nutritional conditions, the highest temperatures favored the production and release of saxitoxins by the cyanobacteria.

Keywords: allelopathy; eutrophication; cyanotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental de <i>R. raciborskii</i> sem exposição e com exposição a presença física (P.F.) e extrato (EX) da macrófita submersa <i>E. densa</i> em diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P) submetidos a temperaturas de 24, 28 e 32°C.....	19
Figura 2 - Biomassa de <i>Raphidiopsis raciborskii</i> em exposição a presença física da macrófita submersa <i>Egeria densa</i> (linhas tracejadas), extratos (linhas pontilhadas) e sem exposição (linhas contínuas) submetidas a diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P) em temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).....	23
Figura 3 - Eficiência fotossintética de <i>R. raciborskii</i> nos tratamentos de exposição a presença física (+P.F.) e extratos (+EX) de <i>E. densa</i> submetida a temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C) em diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P).....	25
Figura 4 - Taxa de crescimento de <i>R. raciborskii</i> nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C) nas condições nutricionais CC, +NP, +N e +P em exposição a presença física e extrato da macrófita <i>E. densa</i>	26
Figura 5 - Inibição exercida pela presença física e extrato de <i>E. densa</i> sobre o crescimento de <i>R. raciborskii</i> nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).	28
Figura 6 - Saxitoxinas totais produzidas por <i>R. raciborskii</i> nos tratamentos na ausência e presença de extratos e biomassa fresca de <i>E. densa</i> em diferentes condições nutricionais nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da ANOVA de medidas repetidas mostrando a influência da exposição à presença física e extratos de <i>E. densa</i> , temperatura, condições nutricionais (nutrientes) e interação entre esses fatores sobre as concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$), taxa de crescimento (dias^{-1}), taxa de inibição (%), eficiência fotossintética (YII) e Saxitoxinas totais ($\mu\text{g L}^{-1}$) de <i>R. raciborskii</i> . ns = não significativo.....	24
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	ARTIGO I	13
2.1	Introdução	16
3	Materiais e métodos	18
3.1	Cultivo da cianobactéria <i>Raphidiopsis raciborskii</i> e da macrófita submersa <i>Egeria densa</i>	18
3.2	Delineamento experimental	19
3.3	Obtenção de extratos de <i>E. densa</i>	20
3.4	Análise estática	20
3.4.1	<i>Biomassa de Raphidiopsis raciborskii</i>	20
3.4.2	<i>Taxa de crescimento</i>	21
3.4.3	<i>Taxa inibição</i>	21
3.5	Análise de saxitoxina	21
3.6	Análise estática	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as florações de cianobactérias tornaram-se preocupantes para gestores e cientistas da água, pois podem comprometer a qualidade da água doce, alterando características físicas, químicas e biológicas desses sistemas (PAERL; OTTEN, 2013; HUISMAN et al., 2018). Florações desses microrganismos podem alterar características organolépticas, como cor, odor e sabor, implicando o tratamento da água (BENAYACHE et al., 2019), diminuem a transparência da água, prejudicando outros organismos autótrofos e podem causar hipóxia, impactando a biota aquática (HUISMAN et al., 2018; GARCÍA, 2021). Além disso, muitas espécies de cianobactérias possuem o potencial de produzir compostos tóxicos, denominados cianotoxinas, que podem comprometer a saúde humana e animal, se tornando problemas para saúde pública (BENAYACHE et al., 2019; WERALUPITIYA et al., 2022).

As funções ecofisiológicas das cianotoxinas não são totalmente compreendidas (HOLLAND; KINNEAR, 2013; PLUGMACHER, 2002), no entanto, estudos mostram que esses metabólitos secundários podem ser utilizados na interação alelopática com o fitoplâncton e plantas aquáticas, e defesa contra herbivoria exercida por zooplâncton e peixes (JIANG et al., 2016; MOHAMED, 2017; ŚLIWIŃSKA-WILCZEWSKA et al., 2021). Humanos e outros animais terrestres podem ser expostos às cianotoxinas através de atividades recreativas, consumo de águas contaminadas e águas potável não devidamente tratadas (MEREL et al., 2013; MOHAMED et al., 2015; MOHAMED, 2016). Essas toxinas podem agir em diversos órgãos, como no fígado, sistema nervoso e pele, sendo denominadas pelo local de ação no organismo animal, como hepatotoxinas, neutoroxinas e dermatoxinas, respectivamente (MEREL et al., 2013; MADEIRA et al., 2016; CHORUS; WELKER, 2021; LEI et al., 2022).

Dentre as principais causas de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas, é citada a eutrofização artificial (WANG et al., 2022). Esse processo se desenvolve em resposta ao aporte de nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), decorrente de fontes antrópicas (ZHAO et al., 2015; LE MOAL et al., 2019). Esses elementos são primordiais para o desenvolvimento e metabolismo desses microrganismos. O N é um elemento necessário para a síntese de proteínas, aminoácidos e ácido nucleico e compõe a estrutura química de muitas cianotoxinas (PEARSON et al., 2016; ZHAO et al., 2023); o P é componente de ácido nucléico, fosfolipídios da membrana celular e do trifosfato de adenosina (ATP) (LIN; LITAKER, SUNDA, 2016; ZHAO et al., 2023). Com o avanço do desenvolvimento urbano e após a

revolução industrial, a ocorrência de lagos e reservatórios impactados pela eutrofização artificial e, conseqüentemente, as florações de cianobactérias aumentaram, causando preocupação para gestores de água e avanço na procura de mitigação dessas florações (TARANU et al., 2015; LE MOAL et al., 2019; YAN et al., 2019).

A temperatura, associada a eutrofização artificial, é um importante fator que pode impulsionar as florações de cianobactérias (PAERL, HUISMAN, 2009; HUISMAN et al., 2018; RICHARDSON et al., 2019). Estudos relatam que altas temperaturas podem beneficiar o crescimento de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos, visto que muitas espécies são bem adaptadas a altas temperaturas e possuem uma taxa de crescimento maior em temperaturas acima de 20°C (MOWE et al., 2015; GIANUZZI et al., 2016). Esse fator torna-se preocupante devido ao aquecimento global decorrente das mudanças climáticas globais. O aumento da temperatura também pode influenciar indiretamente a dominância de cianobactérias através de alterações nas características físico-químicas da água (PAERL; HUISMAN, 2008; HUISMAN et al., 2018). O aquecimento da água pode diminuir a viscosidade e causar estratificação térmica nos ecossistemas aquáticos (PAERL; HUISMAN, 2008), causando o afundamento de organismos fitoplanctônicos que não possuem adaptações para regular a flutuabilidade na água e beneficiando espécies de cianobactérias que possuem aerótopos (vesículas gasosas) (JOEHNK et al., 2008; O'NEIL et al., 2012; CAREY et al., 2012). As mudanças climáticas tendem a alterar os ciclos hidrológicos, aumentando tempestades em algumas regiões e acentuando períodos de seca em outras (HÄDER; BARNES, 2019). O aumento da chuva pode aumentar a lixiviação, aumentando a entrada de nutrientes para os ecossistemas aquáticos (JEPPESEN et al., 2009; SINHA; MICHALAK; BALAJI, 2017), enquanto a seca prolongada pode aumentar o tempo de residência da água, levar ao baixo volume hídrico, condensar as concentrações de nutrientes e intensificar a eutrofização (JEPPESEN et al., 2015; BRASIL et al., 2016).

Dentre as espécies de cianobactérias que vêm ganhando ênfase nos estudos (TAN et al., 2021; MERIGGI et al., 2022), *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya e Suba Raju (= anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) é uma espécie de cianobactéria filamentosa, formadora de florações que podem impactar a biodiversidade aquática e causar problemas socioambientais (MERIGGI et al., 2022). Possui origem tropical e é considerada invasora de regiões temperadas, atualmente apresentando distribuição global por todos os continentes e em diversas zonas climáticas (SINHA et al., 2012; YANG et al., 2018; VICO et al., 2020). Sua distribuição pelo globo é devido a sua alta plasticidade fenotípica, adquirindo a essa espécie sucesso adaptativo em ambientes de diferentes características físico-químicas (PICCINI et al.,

2011; KOKOCINSKI et al., 2017). *Raphidiopsis raciborskii* apresentada adaptações ecofisiológicas que a garante sucesso nos ecossistemas aquáticos, como a produção de células especializadas (heterócitos) na fixação de nitrogênio (N₂) (HUISMAN et al., 2018), as capacitando de permanecer em ambientes com déficit desse nutriente (O'NEIL et al., 2012; SUKENIK, QUESADA, SALMASO, 2015); células de resistência (acinetos) a condições adversas (MALDENER; SUMMERS, SUKENIK, 2014; DOKULIL, 2016). No mais, *Raphidiopsis raciborskii* é adaptada a uma ampla faixa de temperatura (SANTOS-SILVA et al., 2022), podendo crescer em temperaturas de 20 a 35°C, com maiores taxas de crescimento em 30°C (SAKER; GRIFFTHS, 2000). Diante disso, *R. raciborskii* pode ser uma espécie que será beneficiada em cenários de aumento de temperatura em decorrência das mudanças climáticas.

Raphidiopsis raciborskii é uma espécie altamente tóxica, produtora de dois tipos de toxinas, a hepatotoxina cilindrospermopsina (CYN) e a neurotoxina saxitoxina (STX) e seus análogos (GRIFFTHS; SAKER, 2003). No entanto, cepas dessa espécie produzem apenas CYN ou STX, sendo a produção dessas toxinas dependente de padrões geográficos de cepas distribuídas nos continentes (HAANDE et al., 2008). As cepas produtoras de CYN foram registradas na Austrália, Nova Zelândia e no continente asiático (WOOD; STIRLING, 2003; CHONUDOMKUL et al., 2004), enquanto cepas da América do Sul são produtoras de STX (ANTUNES et al., 2015; FERRÃO-FILHO; DA-SILVA, 2020). As STX são classificadas como neurotoxinas e podem causar acidentes em humanos e animais bloqueando canais de sódio nos neurônios e, conseqüentemente, causar paralisia, podendo levar a morte do indivíduo (WIESE et al., 2010). Essas toxinas podem ser bioacumuladas em tecidos de animais e passadas para níveis tróficos superiores através da alimentação (CHRISTENSEN; KHAN, 2020).

Diante dos impactos da eutrofização artificial, florações de cianobactérias e cianotoxinas, maneiras de controle e mitigação dessas florações são de grande relevância. Nesse sentido, as macrófitas submersas vêm sendo apontadas como método para restauração de ecossistemas aquáticos impactados pela eutrofização (HILT; GROSS, 2008; MOWE et al., 2019; AMORIM; MOURA, 2020). Essas plantas podem absorver nutrientes da coluna d'água e controlar a liberação de nutrientes do sedimento (CHAO et al., 2021; WANG et al., 2022), reduzindo as concentrações de nutrientes disponíveis. Além de nutrientes, podem absorver poluentes, como toxinas, atuando como “Sistema de Fígado Verde” nos ecossistemas aquáticos, absorvendo e causando a degradação dessas toxinas (PLUGMACHER et al., 2016; DONG et al., 2022).

As macrófitas submersas podem competir com o fitoplâncton por nutrientes e luminosidade na coluna d'água (ZHOU et al., 2017; MOHAMED, 2017) e servir de refúgio contra a predação para zooplâncton e peixes que consomem o fitoplâncton (ESPINOSA-RODRIGUEZ; SARMA; NANDINI, 2021). No mais, as macrófitas submersas produzem substâncias alelopáticas que afetam o crescimento do fitoplâncton (GAO et al., 2017). Dentre os grupos fitoplanctônicos, as cianobactérias são apontadas como organismos mais sensíveis aos aleloquímicos produzidos por macrófitas submersas (HILT; GROSS, 2008). Os aleloquímicos pertencem a diversas classes químicas, como polifenóis, terpenóides, ácidos graxos, compostos de enxofre e entre outras classes (NAKAI et al., 2012; ZHU et al., 2021). Essas substâncias podem inibir o crescimento de cianobactérias através de danos no aparato fotossintético, afetando a eficiência fotossintética, causar estresse oxidativo e morte celular programada, entre outros fatores (HUANG et al., 2015; ZHU et al., 2021).

Diante das previsões para a intensificação da eutrofização artificial em cenários de aumento da temperatura em decorrência das mudanças climáticas globais (MOWE et al., 2015; WANG; HÄDER; BARNES, 2019; SOININEN; HEINO, 2021), estudos que busquem prever e mitigar os sintomas de florações de cianobactérias são de extrema importância socioeconômica e ambiental.

2 -ARTIGO I-

Artigo a ser submetido à revista:



Inibição do crescimento e toxinas de *Raphidiopsis raciborskii* pela macrófita submersa *Egeria densa* sob diferentes temperaturas e disponibilidade de nutrientes

Jefferson Vitor Melo Cabral^a, Juliana dos Santos Seveirano^a, José Etham de Lucena Barbosa^a

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

* Autor para correspondência: ethambarbosa@hotmail.com

Resumo

Observamos o efeito de diferentes temperaturas e condições de excesso de nutrientes na inibição da macrófita submersa *E. densa* sobre o crescimento, eficiência fotossintética e produção de saxitoxinas da cianobactéria potencialmente tóxicas *R. raciborskii*. Foram utilizados tratamentos de *R. raciborskii* em exposição à presença física e extratos de *E. densa* em meios enriquecidos de nitrogênio (+N), fósforo (+P) independentes e nitrogênio e fósforo em conjunto (+NP) nas temperaturas de 24, 28 e 32°C. Os extratos de *E. densa* afetaram o crescimento, biomassa de *R. raciborskii*, inibindo o crescimento da cianobactéria independentemente das condições nutricionais e temperaturas examinadas. Na temperatura de 24°C, a presença física afetou a eficiência fotossintética de *R. raciborskii*, enquanto não houve efeitos negativos do extrato. Em 28 e 32°C o efeito oposto foi observado sobre a eficiência fotossintética. As maiores concentrações de saxitoxinas foram observadas na temperatura de 28°C em exposição a presença física e na ausência de exposição e em 32°C nos tratamentos sem exposição. *Egeria densa* inibiu o crescimento de *R. raciborskii* mesmo em altas temperaturas e diferentes condições nutricionais, entretanto em temperaturas elevadas as concentrações de saxitoxinas foram altas mesmo na presença de *E. densa*.

Palavras-chave: Alelopatia, Eutrofização, Florações de cianobactérias, Cianotoxinas, Mudanças climáticas.

Abstract

We observed the effect of different temperatures and nutrient excess conditions on the inhibition of the submerged macrophyte *E. densa* on the growth, photosynthetic efficiency and saxitoxin production of the potentially toxic cyanobacteria *R. raciborskii*. Treatments of *R. raciborskii* exposed to physical presence and extracts of *E. densa* in media enriched with nitrogen (+N), phosphorus (+P) independently and nitrogen and phosphorus together (+NP) at temperatures of 24, 28 and 32°C. The extracts of *E. densa* affected the growth, biomass of *R. raciborskii*, inhibiting the growth of cyanobacteria regardless of the nutritional conditions and temperatures examined. At 24°C, the physical presence affected the photosynthetic efficiency of *R. raciborskii*, while there were no negative effects of the extract. At 28 and 32°C the opposite effect was observed on photosynthetic efficiency. The highest concentrations of saxitoxins were observed at a temperature of 28°C in exposure to physical presence and in the absence of

exposure and at 32°C in treatments without exposure. *Egeria densa* inhibited the growth of *R. raciborskii* even at high temperatures and different nutritional conditions, however at high temperatures saxitoxin concentrations were high even in the presence of *E. densa*.

Keywords: Allelopathy, Eutrophication, Cyanobacterial blooms, Cyanotoxins, Climate change.

2.1 Introdução

O crescimento exacerbado da eutrofização artificial (BLAHÁ et al., 2009) aliado aos efeitos das mudanças climáticas têm comprometido a viabilização de serviços ecossistêmicos propiciados por ecossistemas aquáticos para seres humanos e outros animais. Esses processos são apontados como fatores que impulsiona florações excessivas de cianobactérias (O'NEIL et al., 2012; DALU & WASSERMAN, 2018), organismos que causam problemas para qualidade da água. Muitas espécies produzem compostos que alteram características organolépticas, reduzem a transparência e concentrações de oxigênio dissolvido nesses ecossistemas (SILVONEN & JONES, 1999; HUANG & ZIMBA, 2019). Além disso, as cianobactérias são potenciais produtoras de metabólitos secundários tóxicos (as cianotoxinas) para seres humanos e animais (WALLS et al., 2018; HUANG & ZIMBA, 2019; FERRÃO-FILHO & SILVA, 2020).

O aumento da temperatura associado ao aumento das concentrações de nutrientes pode ser benéfico para processos metabólicos de cianobactérias, visto que muitas espécies possuem taxas de crescimento maiores em temperaturas acima de 25°C (PAERL & OTTEN, 2013; THOMAS & LITCHMAN, 2016; HUISMAN et al., 2018). No mais, as mudanças climáticas podem favorecer as cianobactérias indiretamente através de mudanças nas características físico-químicas dos ambientes aquáticos (MONCHANP et al., 2017; HUISMAN et al., 2018), como estratificação térmica, aumento no carreamento de nutrientes (CAREY et al., 2012; CALANDRINO, 2016; PAERL et al., 2016), períodos de seca prolongado e aumento no tempo de residência da água (BRASIL et al., 2016; WOOLWAY et al., 2021).

Raphidiopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya e Subba Raju (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) é uma espécie de cianobactéria de origem tropical, considerada invasora em zonas temperadas, atualmente distribuída por todos os continentes do mundo e vêm ganhando ênfase por devido a sua capacidade de produzir densas florações (ANTUNES et al., 2012; SUKENIK et al., 2012; BURFORD et al., 2016; MERIGGI et al., 2022). Seu sucesso está relacionado a suas adaptações ecofisiológicas (Figueredo et al., 2007; WU et al., 2009), como a fixação de N₂, as permitindo viver em ambientes com déficit de nitrogênio, células de resistência e regulação da posição na coluna de água (PAERL & HUISMAN, 2009; BURFORD et al., 2016). Essa espécie tolera uma ampla variação nas concentrações de nutrientes e é bem adaptada a altas temperaturas (XIAO et al., 2017; JIA et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2022). No mais, *Raphidiopsis raciborskii* é potencialmente tóxica, e têm sido relatadas como produtora das cianotoxinas saxitoxinas (STX) e

cilindrospermopsinas (CYN), entretanto, cepas isoladas na América do Sul produzem apenas STX, enquanto cepas australianas, neozelandesas e asiáticas produzem CYN (TESTAI et al., 2016; HUANG & ZIMBA, 2019; Vico et al., 2020). As STX, conhecidas como toxinas paralíticas de moluscos (PSP), são classificadas como neurotoxinas e bloqueiam os canais de sódio dos neurônios, causando paralisia no indivíduo, podendo causar a morte (CODD et al., 1999; BURATTI et al., 2017; HUANG & ZIMBA, 2019).

Diante dos impactos de florações de cianobactérias em ambientes aquáticos e cenários de previsões sobre as mudanças climáticas, encontrar organismos que possam atuar no biocontrole de florações é de fundamental importância ecológica e econômica (CHEN et al., 2012). Essas plantas podem competir com cianobactérias por luz e nutrientes e servir como abrigo contra predação para zooplâncton predador de cianobactérias (DONK & BUND, 2002; BICUDO et al., 2007; FERREIRA et al., 2018; ESPINOSA-RODRIGUEZ et al., 2020). Além desses mecanismos, a alelopatia permite que as macrófitas inibam crescimento do fitoplâncton, principalmente cianobactérias, através da produção de substâncias químicas (HILT & GROSS, 2007; NAKAI et al., 2012; ZHU et al., 2021), afetando crescimento e o metabolismo das cianobactérias (ZUO et al., 2013; MOHAMED, 2017; AMORIM & MOURA, 2020). Essas substâncias podem inibir a atividade fotossintética, causar danos no aparato fotossintético e na transferência de elétrons e estresse oxidativo nas cianobactérias (ZHU et al., 2010; Wu et al., 2013; NI et al., 2018; ZHU et al., 2021). Métodos para analisar a inibição do crescimento de cianobactérias podem ser desenvolvidos em abordagem experimental de coexistência de cianobactérias com macrófitas simultaneamente com extratos obtidos da biomassa vegetal (GROSS et al., 2008).

Egeria densa Planch. é uma espécie de macrófita submersa nativa da América do Sul, formadora de extensos bancos subaquáticos, comumente encontrada em reservatórios de regiões tropicais (ESPINOSA-RODRÍGUEZ et al., 2016; AMORIM et al., 2017; BARBOSA et al., 2020). Esta espécie potencial produtora de aleloquímicos se mostrou eficaz na inibição do crescimento de cianobactérias produtoras de toxinas (NAKAI et al., 1999; MOHAMED, 2017; SENAVITATHNA et al., 2021), possuindo um sistema antioxidante eficaz para o controle do estresse oxidativo causado por cianotoxinas, a permitindo competir diretamente com esses microrganismos (VANDERSTUKKEN et al., 2011; AMORIM et al., 2017). Em estudo recente foi possível observar que a presença física de *E. densa* conseguiu suprimir o crescimento de *R. raciborskii* e diminuir as concentrações de saxitoxinas (BARBOSA et al., 2022). No entanto, apenas as maiores concentrações de extratos inibiram o crescimento da cianobactéria, mas não reduziram as concentrações de saxitoxinas da água (BARBOSA et al.,

2022). No entanto, o efeito da inibição dessa macrófita sobre o crescimento e toxinas de cianobactéria submetidos a aumento da temperatura e condições nutricionais não é totalmente compreendido.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inibição exercida pela macrófita submersa *Egeria densa* sobre o crescimento e produção de toxina da cianobactéria potencialmente tóxica *R. raciborskii* em diferentes temperaturas e condições de enriquecimento de fósforo e nitrogênio, em conjunto e individualmente. A partir disso, nossa hipótese é que o aumento da temperatura e condições de excesso de nutrientes reduz o potencial de inibição exercido por *E. densa* sobre o crescimento e produção de saxitoxinas de *R. raciborskii*.

3. Materiais e métodos

3.1 Cultivo da cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii* e da macrófita submersa *Egeria densa*

A cianobactéria *R. raciborskii* (ITEP-A1) foi disponibilizada pelo Instituto de Tecnologia de Pernambuco (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2016), essa cepa é potencial produtora de saxitoxina, neosaxitoxinas e decarbomoil-saxitoxina (VILAR & MOLICA, 2020). Para a manutenção da cepa em cultivo de cianobactérias as culturas foram mantidas em frasco de Erlenmeyer de 500mL, contendo 250mL de meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1967), com pH de 8,0. As culturas foram mantidas sob temperatura controlada de 24 ± 1 °C, iluminação feita através de lâmpadas fluorescentes com intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h.

A macrófita submersa *E. densa* foi coletada no Reservatório Epitácio Pessoa, localizado no município de Boqueirão, no estado da Paraíba, Brasil ($07^{\circ} 28' 4''$ e $07^{\circ} 170' 33' 32''$ S; $36^{\circ} 08' 23''$ e $36^{\circ} 16' 51''$ W). Os exemplares foram lavados delicadamente em água corrente com auxílio de escovas com cerdas macias, de modo a remover todos os resíduos do ambiente e organismos aderidos, e posteriormente foram cultivados em aquários (20 L) com água destilada e meio ASM-1 até a realização do experimento. Assim como as condições de cultivo das cianobactérias, as macrófitas foram cultivadas sob temperatura controlada de 24 ± 1 °C, taxa luminosa ajustada e fotoperíodo. As cianobactérias e as macrófitas aquáticas foram previamente aclimatadas nas condições de temperatura e nutrientes da análise experimental por duas semanas.

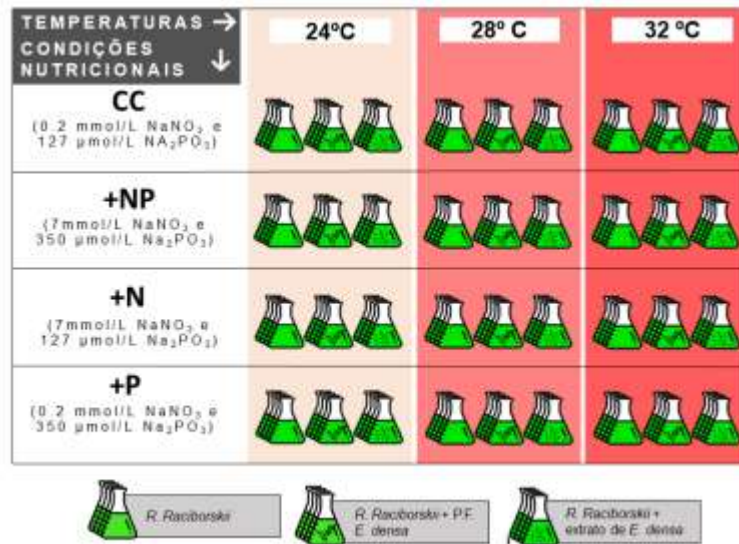
3.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em Erlenmeyer de 250mL contendo 200mL de meio de cultura. A cepa de *R. raciborskii* foi incubada conforme a taxa de crescimento exponencial nas concentrações de $4.0 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$ e para a macrófita *E. densa* foi utilizado 1g PF L^{-1} , conforme observado por Barbosa et al. (2022) como biomassa mínima capaz de inibir o crescimento de *R. raciborskii*.

Foram utilizados tratamentos de *R. raciborskii* em interação com a presença física e extratos de *E. densa* em quatro condições nutricionais (Fig. 1): controle (CC), com 0,2 mmol L^{-1} de nitrato- NaNO_3 e 127 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato- NA_2PO_3 , que correspondem aos concentrações encontradas no meio ASM-1; enriquecido com nitrogênio (+N), através da adição de 7 mmol L^{-1} de NaNO_3 ; enriquecido com fósforo (+P), através da adição de 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NA_2PO_3 ; e enriquecido com nitrogênio e fósforo (+NP), com a adição de 7mmol L^{-1} de NaNO_3 e 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NA_2PO_3). Os tratamentos foram acondicionados nas temperaturas de 24, 28 e 32°C, simulando condições de aumento da temperatura.

Os tratamentos foram incubados em incubadora BOD com condições de temperatura, luminosidade e fotoperíodo controladas. Todas as unidades amostrais foram homogeneizadas diariamente e rearranjadas randomicamente para evitar diferenças nas intensidades luminosas da incubadora. Para o experimento foram utilizadas 4 réplicas de cada tratamento e o experimento teve duração total de 12 dias, com retiradas de amostras nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 para quantificação da biomassa de *R. raciborskii*. Além disso, foram retiradas amostras no dia 0 e 12 para análise de nutrientes das séries nitrogenadas e fosfatadas e análise de saxitoxina.

Figura 1 - Delineamento experimental de *R. raciborskii* sem exposição e com exposição a presença física (P.F.) e extrato (EX) da macrófita submersa *E. densa* em diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P) submetidos a temperaturas de 24, 28 e 32°C.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

3.3 Obtenção de extratos de *E. densa*

Para obtenção dos extratos aquosos de *E. densa* foi utilizado a metodologia proposta por Mareková et al. (2021). A biomassa vegetal (1g PF L⁻¹) foi lavada para retirar todos os organismos aderidos e resíduos do ambiente e triturada, seca e homogeneizada com metanol (70%) na proporção de 1:100 por 24 horas. Após a solução foi filtrada em filtros de vidro com porosidade de 0,45 e o filtrado foi rotaevaporado para evaporação total do metanol. O metanol foi escolhido como solvente por ser um solvente lipofílico que extrai compostos lipídicos dos tecidos da macrófita que possam atuar como aleloquímicos (GROSS et al., 2007).

3.4 Análise de dados

3.4.1 Biomassa de *Raphidiopsis raciborskii*

As concentrações de clorofila foram utilizadas como preditor da biomassa de *R. raciborskii* nos tratamentos. Foi mensurada através do fluorômetro modulado por amplitude de pulso no PHYTO-PAM (WALZ-PHYTO-PAM II/ED).

3.4.2 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento (μ ; dia⁻¹) de *R. raciborskii* foi realizada através da fórmula proposta por Wood et al. (2005):

$$(\mu; \text{dia}^{-1}) = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_{t_0})}{t - t_0}$$

Onde, μ representa a velocidade específica de crescimento no dia, N_{t_0} é concentração de clorofila-a no tempo inicial e N_t é a concentração de clorofila-a no tempo final.

3.4.3 Taxa inibição

A taxa de inibição de *R. raciborskii* nos tratamentos expostos a presença física e o extrato de *E. densa* foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$TI(\%) = \frac{N_m - N_c}{N_c} \times 100$$

Onde, N_m é a concentração de clorofila-a de *R. raciborskii* em exposição a presença física ou extratos de *E. densa* e N_c é a concentração de clorofila-a no tratamento controle.

3.5 Análise de saxitoxina

Para determinar as concentrações de saxitoxinas totais foram retiradas alíquotas de 2mL dos tratamentos. As amostras foram congeladas a -40°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento com intuito de romper as células de *R. raciborskii* e liberar a saxitoxina intracelular. A determinação das concentrações foi realizada pelo método *Enzyme-Linker Immuno Sorbent Assay* (ELISA) com auxílio de kit de microplacas de Abraxis, Inc (Warminster, Pa) seguindo instruções do fabricante e a leitura foi realizada por um leitor de microplacas ASYS A-5301 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Áustria).

3.6 Análise estática

A normalidade e homoscedasticidade dos dados foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-smirnov e Levene. Para verificar se houve diferença significativa nas concentrações de clorofila-a, taxa de crescimento, inibição e toxinas de *R. raciborskii* quanto a natureza de exposição, temperatura e condições nutricionais foi realizado uma Análise de Variância de medidas repetidas e posteriormente, Teste de Tukey. As análises foram realizadas levando em consideração nível de significância de 5% no Software R pra Windows (R Core Team, 2018).

4 RESULTADOS

A biomassa de *Raphidiopsis raciborskii* foi afetada significativamente pela exposição a presença física e extrato de *Egeria densa* ($F=1289.38$; $p<0.001$), temperatura ($F=490.18$; $p<0.001$), condições nutricionais ($F=13.02$; $p<0.05$), interação entre os fatores exposição e temperatura ($F=277.79$; $p<0.001$), exposição e condições nutricionais ($F=17.40$; $p<0.05$) (Fig. 2; Tabela 1)

Em 24°C, os tratamentos sem exposição a *E. densa* (isto é, presença física e extrato) obtiveram maiores biomassas de *R. raciborskii*, chegando ao último dia com 881,1 (CC), 795,7 (+P), 774,4 (+N) e 630 $\mu\text{g L}^{-1}$. As menores biomassas foram observadas nos tratamentos expostos à presença física da macrófita a partir do sexto dia, alcançando valores abaixo de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ao final do experimento, independentemente das condições nutricionais (Fig. 2 A). O extrato também reduziu a biomassa de *R. raciborskii*, chegando ao último dia de experimento com 404,8, 268,8, 217,8 e 86,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos tratamentos +P, +N, +NP e CC, respectivamente.

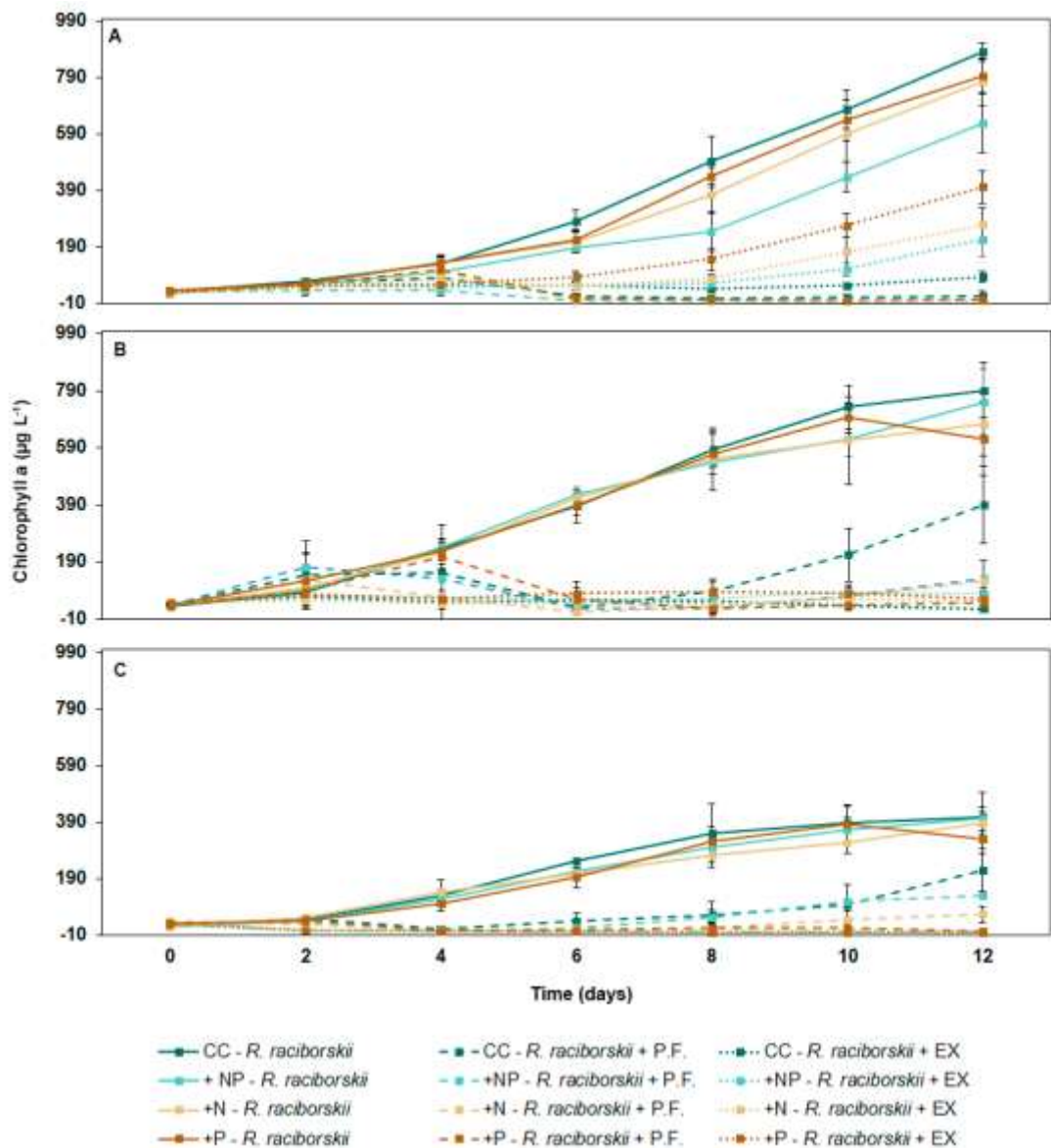
Na temperatura de 28°C, a biomassa de *R. raciborskii* sem exposição à *E. densa* foram 792, 751, 671 e 622 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos tratamentos CC, +NP, +N e +P, respectivamente, no último dia de experimento (Fig. 2B). A biomassa de *R. raciborskii* em exposição à presença física reduziu a partir do quarto dia de experimento chegando ao final com 391, 131, 123 e 47 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CC, +NP, +N e +P, respectivamente). No tratamento CC, apesar do decréscimo no sexto dia, a partir do oitavo dia houve aumento. Em exposição ao extrato, as biomassas chegaram a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em CC e 70, 49 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ em +NP, +N e +P, respectivamente.

Os tratamentos de *R. raciborskii* sem exposição à *E. densa* em 32°C apresentaram menores biomassas (CC=408, +NP=402, +N=387 e +P=329 $\mu\text{g L}^{-1}$) quando comparados aos tratamentos em 24 e 28°C (Fig. 2C). A partir do segundo dia de estudo foi possível observar redução da biomassa de *R. raciborskii* quando exposta à *E. densa*, com concentrações menores de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, independentemente das condições nutricionais e na presença física no tratamento +P. Quando expostos à presença física as concentrações dos tratamentos CC, +NP e +N foram de 221, 132 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A eficiência fotossintética (YII) de *R. raciborskii* foi afetada significativamente quanto a natureza de exposição ($F=199.04$; $p<0.001$), temperatura ($F=81.34$; $p<0.001$) e interação entre os fatores natureza de exposição e temperatura ($F=105.27$; $p<0.001$) (Fig. 3; Tabela 1). A presença física de *E. densa* teve maior efeito na redução da eficiência fotossintética de *R. raciborskii* na temperatura de 24°C, principalmente no tratamento +NP, seguido dos tratamentos +N, +P e CC (Fig. 3A). Foi possível observar a redução do YII a partir do quarto

dia de experimento. A exposição ao extrato não afetou negativamente o YII da cianobactéria na temperatura de 24°C. A YII de *R. raciborskii* nos tratamentos a 28 e 32°C (Fig. 3 B e C, respectivamente) foi afetada negativamente pelo extrato de *E. densa*. Em 28°C foi observado a redução do YII a partir do quarto dia, enquanto nos tratamentos expostos a 32°C a YII foi baixa durante todo período experimental.

Figura 2 - Biomassa de *Raphidiopsis raciborskii* em exposição a presença física da macrófita submersa *Egeria densa* (linhas tracejadas), extratos (linhas pontilhadas) e sem exposição (linhas contínuas) submetidas a diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P) em temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).



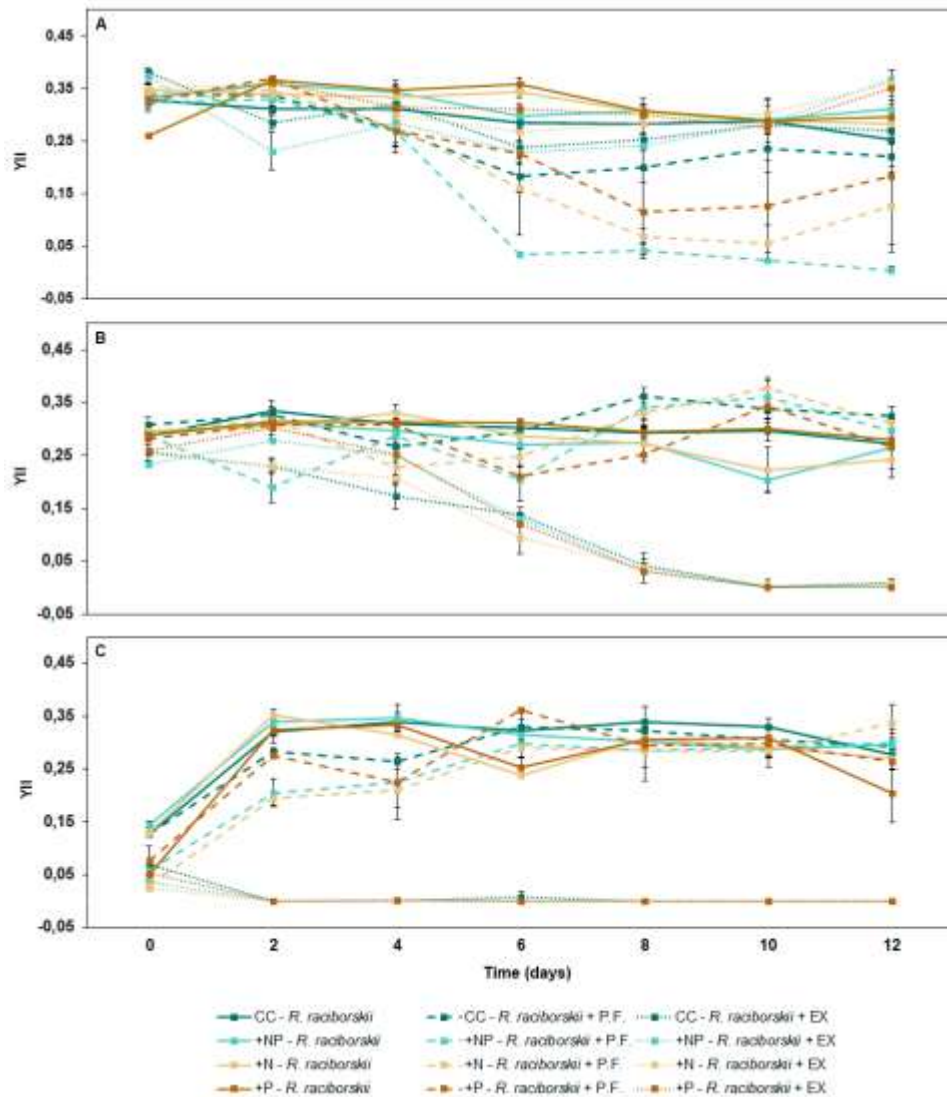
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Tabela 1 - Resumo da ANOVA de medidas repetidas mostrando a influência da exposição à presença física e extratos de *E. densa*, temperatura, condições nutricionais (nutrientes) e interação entre esses fatores sobre as concentrações de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$), taxa de crescimento (dias^{-1}), taxa de inibição (%), eficiência fotossintética (YII) e Saxitoxinas totais ($\mu\text{g L}^{-1}$) de *R. raciborskii*. ns = não significativo

Fatores	Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Taxa de crescimento (dias^{-1})			Taxa de inibição (%)			Y(II)			Saxitoxinas totais ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	df	F	p	df	F	p	df	F	p	df	F	p	df	F	p
Exposição	2	1289.38	<0.001	2	6611.25	<0.001	1	1.32	ns	2	199.04	<0.001	2	237.91	<0.001
Temperatura	2	490.18	<0.001	2	705.22	<0.001	2	1.31	ns	2	81.34	<0.001	1	113.86	<0.001
Nutriente	3	13.02	<0.05	3	134.61	<0.001	3	0.16	ns	3	1.900	ns	3	6.98	<0.001
Exposição*temperatura	4	277.79	<0.001	4	2604.22	<0.001	2	2.98	ns	4	105.27	<0.001	2	169.47	<0.001
Exposição*nutriente	6	17.40	<0.05	6	145.55	<0.001	3	0.25	ns	6	2.03	ns	6	6.22	<0.001
Temperatura*nutriente	6	7.73	ns	6	69.27	<0.01	6	0.36	ns	6	0.66	ns	3	2.89	<0.05
Exposição*temperatura*nutrientes	12	3.08	ns	12	43.97	<0.01	6	0.11	ns	12	0.84	ns	6	7.75	ns
Exposição*temperatura*nutriente*tempo	72	11.38	<0.05	30	451.56	<0.001	24	7.02	<0.001	36	8.46	<0.001	24	87.21	<0.001

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 3 - Eficiência fotossintética de *R. raciborskii* nos tratamentos de exposição a presença física (+P.F.) e extratos (+EX) de *E. densa* submetida a temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C) em diferentes condições nutricionais (CC, +NP, +N e +P).



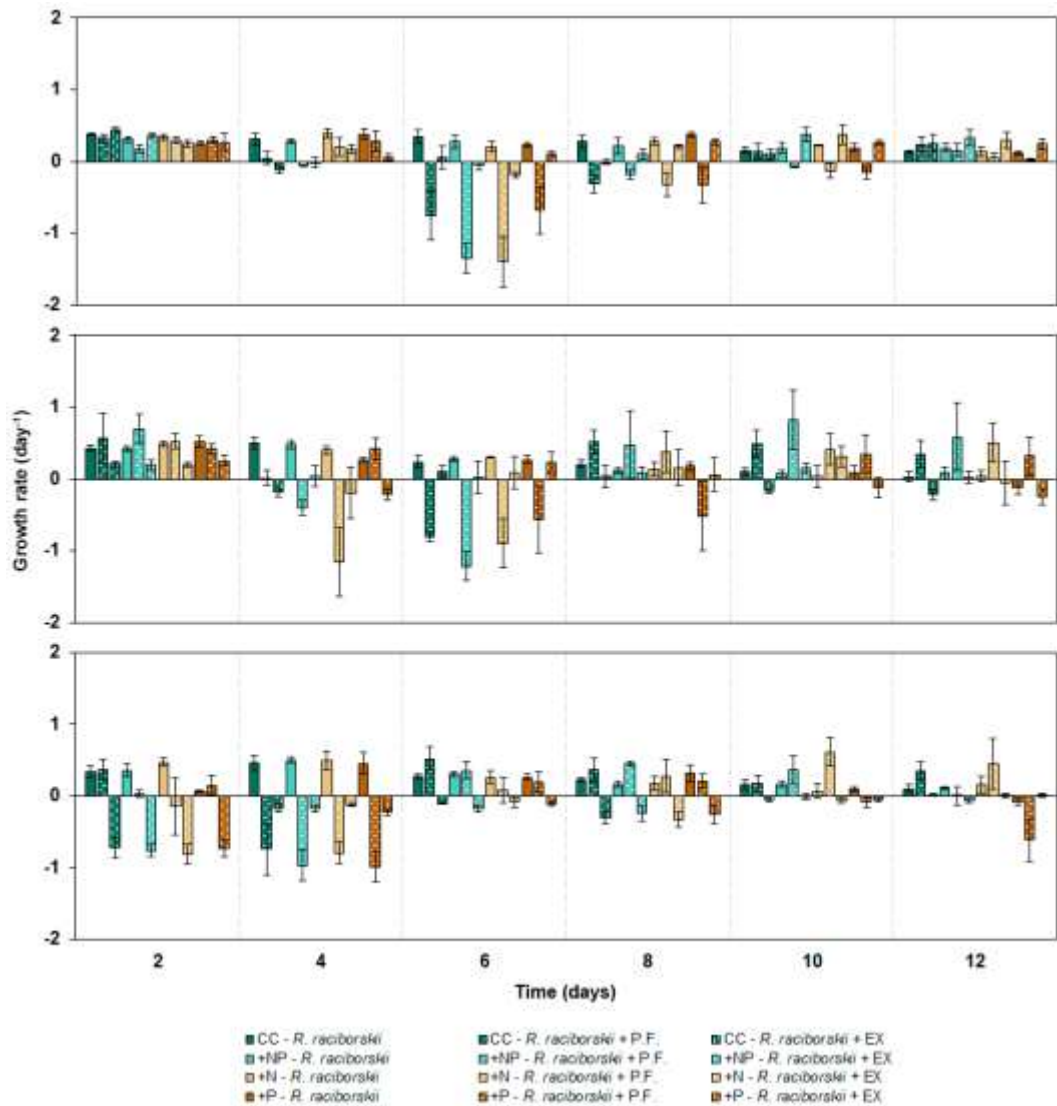
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

A taxa de crescimento de *R. raciborskii* foi afetada significativamente pela exposição à macrófita ($F=6611.25$; $p<0.001$), temperatura ($F=702.22$; $p<0.001$), condições nutricionais ($F=134.61$; $p<0.01$), período experimental ($F=1462.51$; $p<0.001$) e interação entre os fatores (Tabela 1; Fig. 4).

As taxas de crescimento de *R. raciborskii* quando não esteve exposta a P.F. ou extratos de *E. densa* foram positivas durante todo o período de estudo, independentemente das condições nutricionais e temperatura testadas. Na temperatura de 24°C as menores taxas de crescimentos foram observadas no sexto dia nos tratamentos +N, +NP, CC e +P em exposição à presença física de *E. densa* (Fig. 4A). No entanto, no último dia de experimento as taxas de crescimento

foram positivas para todos os tratamentos expostos à presença física e extrato. Na temperatura de 28°C, as menores taxas de crescimento foram no segundo e quarto dia de experimento na exposição à presença física em todas as condições nutricionais (Fig. 4B). No entanto, no décimo e no último dia, as taxas de crescimento dos tratamentos em exposição à presença física apresentaram crescimento maior que os tratamentos sem exposição. O extrato da macrófita afetou negativamente o crescimento de *R. raciborskii* do segundo ao décimo na temperatura de 32°C em todas as condições nutricionais, enquanto a presença física apresentou menor crescimento no quarto dia (Fig. 4C).

Figura 4 - Taxa de crescimento de *R. raciborskii* nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C) nas condições nutricionais CC, +NP, +N e +P em exposição a presença física e extrato da macrófita *E. densa*.

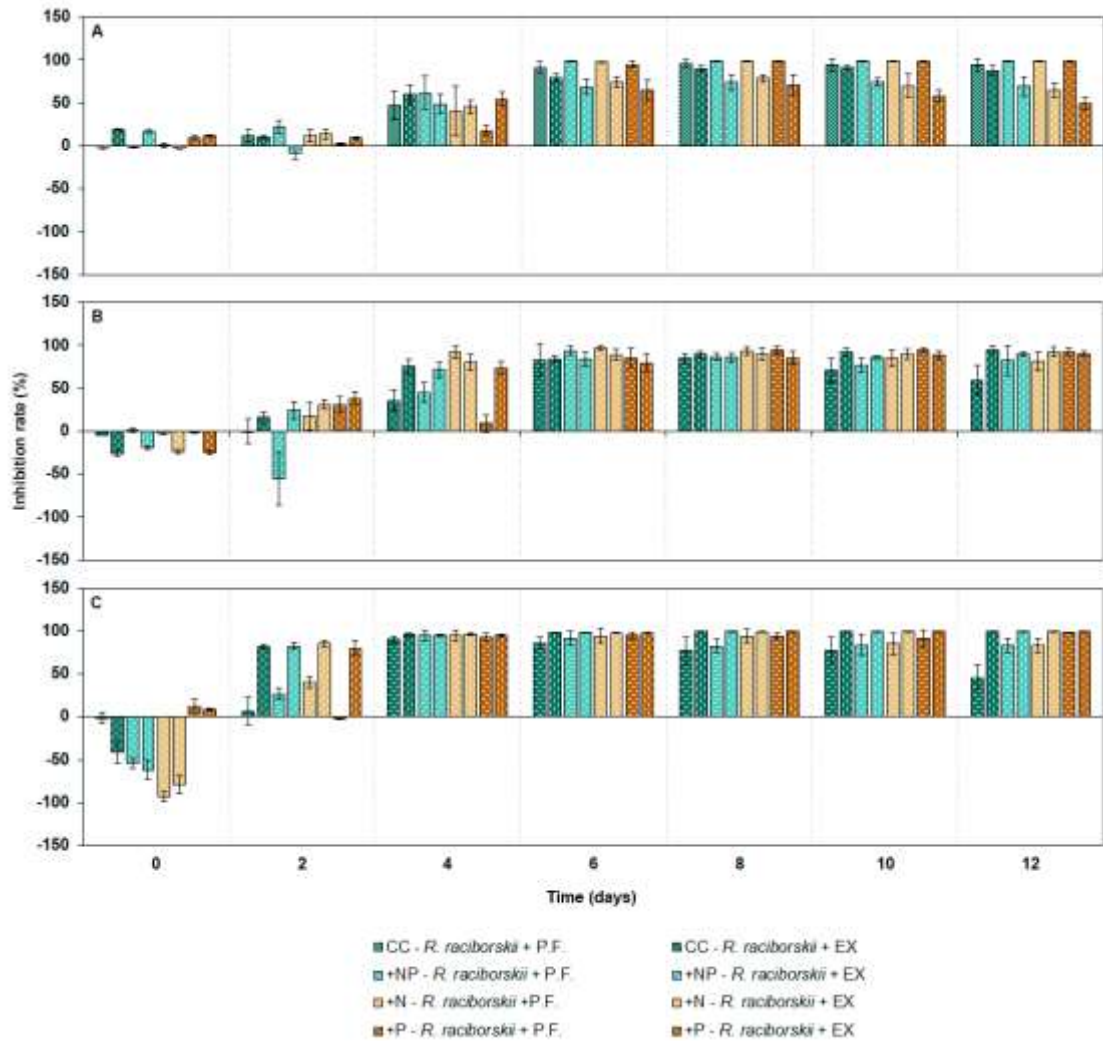


Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

A inibição de *R. raciborskii* não houve influência significativa quanto a natureza de exposição, temperatura, condições nutricionais e interação esses fatores ($p>0.05$) (Tabela 1; Fig. 5). *Raphidiopsis raciborskii* foi inibida em todas as condições nutricionais a partir do quarto dia de experimento, independentemente da natureza de exposição (presença física ou extrato) e temperatura amostrada. Na temperatura de 24°C a inibição foi superior a 90% no sexto dia quando exposta a presença física de *E. densa* em todas as condições nutricionais, chegando ao último dia com 99% em +NP, +N e +P e 94% em CC (Fig. 5A). A eficácia da inibição exercida pelo extrato foi inferior à presença física na temperatura de 24°C nos tratamentos +NP, +N e +P, chegando ao último dia com 69, 65 e 49%, respectivamente.

A inibição na temperatura de 28°C foram semelhantes quanto a natureza de exposição durante o período de estudo, no entanto, no último dia no tratamento CC o extrato apresentou maior inibição (95%) que a presença física (59%) (Fig. 5B). Em 32°C ocorreu de forma semelhante, no segundo dia o extrato teve efeito mais eficaz em todas condições nutricionais, mas foi igualada com a presença física ao longo do experimento (Fig. 5C). Os tratamentos CC, +NP e +N tiveram efeito mais eficaz do extrato no último dia com 99% nesses tratamentos, enquanto a presença física teve 45, 83 e 83%, respectivamente.

Figura 5 - Inibição exercida pela presença física e extrato de *E. densa* sobre o crescimento de *R. raciborskii* nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).

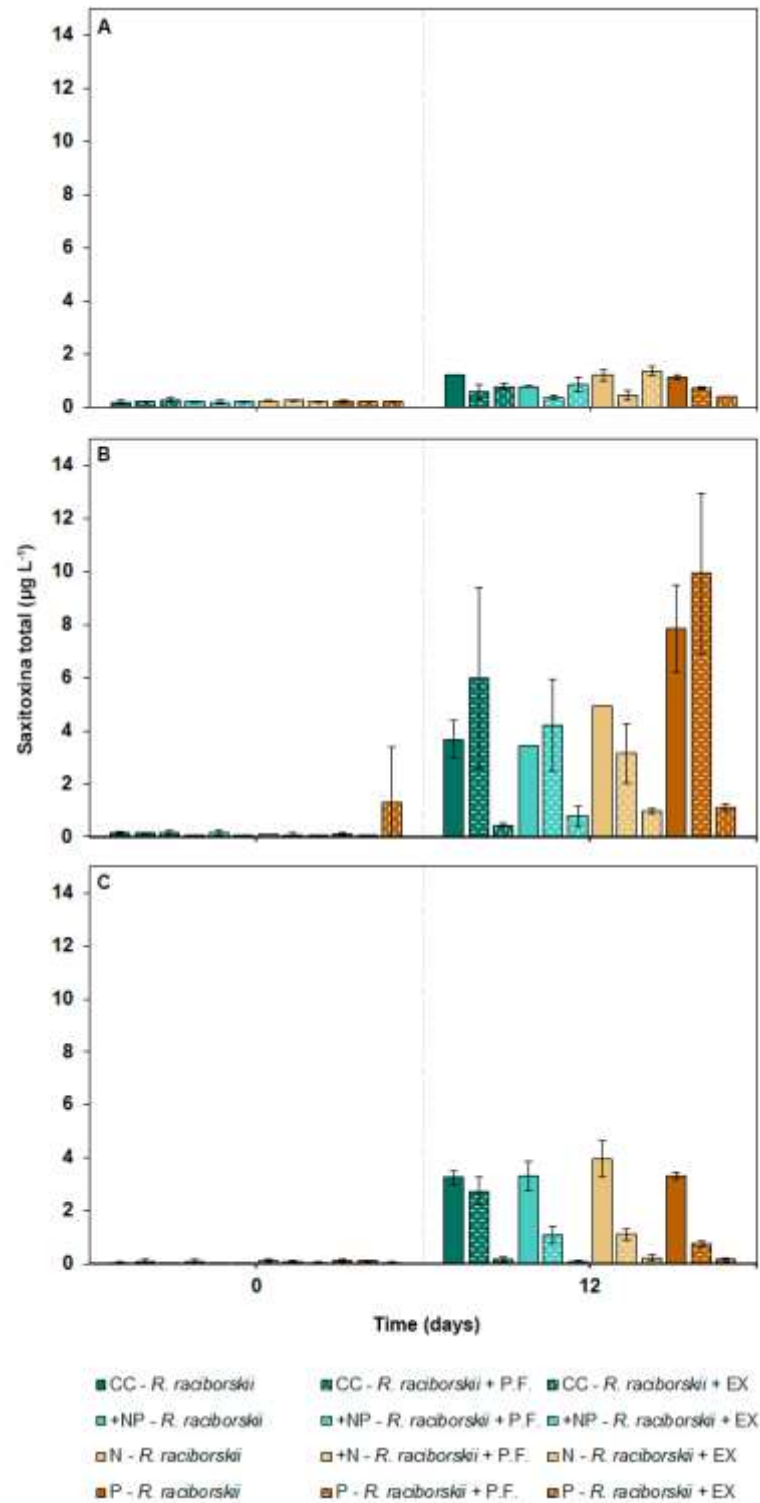


Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

As concentrações de STX totais produzidas por *R. raciborskii* foram afetadas significativamente pela exposição aos extratos e a presença física de *E. densa* ($F=237.91$; $p<0.001$), temperatura ($F=113.86$ $p<0.001$), condições nutricionais ($F=6.98$; $p<0.001$) e interações entre os fatores exposição e temperatura ($F=169.47$; $p<0.001$), exposição e condições nutricionais ($F=6.22$; $p<0.001$), temperatura e condições nutricionais ($F=2.89$; $p<0.001$) (Tabela 1; Fig. 6). As maiores concentrações de STX totais foram observadas nos tratamentos incubados a 28°C, com maiores concentrações nos tratamentos de +P, CC e +NP em exposição a presença física de *E. densa* ($9,9$, $5,9$ e $4,2$ $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) (Fig. 6^a). Todos os tratamentos na ausência e presença física de *E. densa* tiveram concentrações de STX totais acima de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 28°C.

Em 32°C as maiores concentrações de STX totais foram nos tratamentos com a ausência de *E. densa*, ultrapassando 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, independentemente das condições nutricionais. Nos tratamentos em exposição a presença física, o tratamento +CC apresentou maior concentrações de STX total com 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$. *Raphidiopsis raciborskii* em exposição a P.F. nas outras condições nutricionais apresentaram valores acima de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na temperatura de 32°C todos os tratamentos em exposição ao extrato obtiveram menores concentrações de STX totais, chegando a 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na temperatura de 24°C as concentrações de STX totais não ultrapassaram as concentrações de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, com maiores concentrações nos tratamentos CC, +N e P na ausência da macrófita e em +N em exposição aos extratos.

Figura 6 - Saxitoxinas totais produzidas por *R. raciborskii* nos tratamentos na ausência e presença de extratos e biomassa fresca de *E. densa* em diferentes condições nutricionais nas temperaturas de 24 (A), 28 (B) e 32°C (C).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a macrófita submersa *Egeria densa* pode afetar a eficiência fotossintética da cianobactéria *R. raciborskii*, inibir o crescimento e reduzir a biomassa em diferentes condições de enriquecimento de nutrientes (nitrogênio e fósforo) sob diferentes temperaturas. No entanto, as concentrações de toxinas aumentaram na exposição a presença física da macrófita na segunda maior temperatura. Nossas hipóteses que a inibição do crescimento e produção de toxinas seria reduzido em temperaturas mais altas e excesso de nutrientes foi parcialmente aceita, visto que as concentrações de toxinas aumentaram em interação com *E.densa* na temperatura de 28°C. A inibição da biomassa e eficiência fotossintética de *R. raciborskii* por extratos obtidos de *E. densa* sugere a ação de substâncias alelopáticas que afetam o crescimento dessa cianobactéria.

O efeito inibitório de *E. densa* sobre o crescimento de *R. raciborskii* foi registrado anteriormente, chegando a 100% nos tratamentos em exposição à presença física, no entanto, o efeito exercido pelo extrato fora mais fraco (BARBOSA et al., 2022). A inibição da comunidade cianobactéria foi observado em mesocosmo em reservatório hipereutrófico no nordeste do Brasil, reduzindo a biomassa em 83% em meio repleto de nutriente, excluindo a competição por nutrientes e luz como fator determinante (AMORIM et al., 2020). Resultado similares foram observados em experimentos de mesocosmo utilizando *E. densa* em lagos rasos subtropicais, no qual essa espécie controlou o crescimento do fitoplâncton em condições não limitantes de nutrientes (VANDERSTUKKEN et al., 2011). Nossos resultados estão de acordo com estudos que trazem *E. densa* como biocontrole para o crescimento do fitoplâncton, principalmente cianobactérias (NAKAI et al., 1999; VANDERSTUKKEN et al., 2014; ESPINOZA-RODRIGUEZ et al., 2016; BARBOSA et al., 2021).

Observamos que a exposição ao extrato e biomassa de *E. densa* inibiu o crescimento de *R. raciborskii* e reduziu a biomassa em diferentes temperaturas e condições de enriquecimento de nutrientes (nitrogênio e fósforo). No entanto, a cianobactéria apresentou maior resistência a exposição aos extratos na temperatura de 24°C e a presença física nas maiores temperaturas testadas. A temperatura pode ser um importante fator que influencia na resistência de cianobactérias expostas a estresses. Aleloquímicos isolados da macrófita *Myriophyllum spicatum* afetaram as taxas de crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* em temperaturas e condições luminosas mais baixas (NAKAI et al., 2014). E Hong et al. (2018) observou que o aumento da temperatura causou resistência a inibição para *M. aeruginosa*. *Rahidiopsis raciborskii* apresentou menor biomassa nos tratamentos de 32°C quando na

ausência de *E. densa*, sugerindo que essa temperatura foi desfavorável para o crescimento ótimo da cianobactéria. Fatores ambientais desfavoráveis para o crescimento desses microrganismos conjuntamente com a força de competição interespecífica podem aumentar a suscetibilidade à inibição (NAKAI et al., 2014; ZHU et al., 2021). Enquanto, fator favoráveis pode podem reduzir as forças de inibição (SENAVIRATHNA et al., 2021).

A temperatura influenciou o efeito da natureza de exposição sobre a biomassa de *R. raciborskii*. A interação com a macrófita *E. densa* teve maior poder de redução da biomassa da cianobactéria na temperatura de 24°C, enquanto na temperatura de 32°C o extrato foi mais eficaz. A inibição do fitoplâncton em coexistência com macrófitas pode ser favorecida pela liberação contínua de substâncias químicas na água, afetando o crescimento continuamente (NAKAI et al., 1999; GAO et al., 2017). No entanto, condições ambientais podem influenciar sobre a fisiologia dos organismos e afetar a produção e excreção de aleloquímicos (ENHARD & GROSS, 2005; GE et al., 2012a, 2012b). A utilização de extratos pode ser mais eficaz durante os primeiros dias por possuir maiores concentrações de substâncias químicas comparado ao excretado pela planta no ambiente (Gross, 2000; Gao et al., 2017). Porém, no ambiente esses aleloquímicos estão expostos às condições ambientais, sujeitos a degradação e transformação em compostos mais ou menos eficientes (CHENG et al., 2017; WU, 2016; LI et al., 2021).

A alelopatia exercida por macrófitas submersas contra o fitoplâncton pode auxiliar na competição por recursos, como luz e nutrientes, nos ecossistemas aquáticos (LEGRAND et al., 2003; NAKAI et al., 2012). Muitos estudos relatam que esses produtos alelopáticos excretados por macrófitas podem afetar negativamente o metabolismo de cianobactérias, causando estresse oxidativo, danos à membrana celular, morte celular programada e danos ao aparato fotossintético, consequentemente causando a inibição da fotossíntese (SHAO et al., 2009; ZHU et al., 2010; WANG et al., 2016; MOHAMED, 2017; NI et al., 2018; ZHOU et al., 2018; ZHU et al., 2021). Tanto a presença física quanto a exposição aos extratos de *E. densa* causou danos na eficiência fotossintética de *R. raciborskii*, independentemente da temperatura e condições nutricionais testadas. A eficiência quântica efetiva (YII) representa a capacidade de organismos autótrofos em converter energia luminosa em energia química, a redução desse parâmetro pode levar a inibição da capacidade fotossintética, e consequentemente a redução da biomassa algal (ZHU et al., 2011; ZHOU et al., 2013; HUANG et al., 2015). Gao et al. (2017b) e Wang et al. (2016) mostraram que aleloquímicos isolados de macrófitas afetou a eficiência fotossintética e inibiu *M. aeruginosa*. Extratos aquosos das macrófitas *Ceratophyllum demersum* e *Vallisneria*

natans também causaram a redução da eficiência em *M. aeruginosa*, dificultando o crescimento da cianobactéria (HAN et al., 2021).

Nossos resultados de saxitoxinas totais sugerem que a temperatura, nutrientes e exposição a macrófita *E. densa* e extrato influenciou a produção e excreção de saxitoxinas de *R. raciborskii*. Barbosa et al. (2022) mostrou que quando *R. raciborskii* esteve em interação com *E. densa* as concentrações de STXs totais foram menores. O aumento da biomassa de *R. raciborskii* nos primeiros dias de experimento seguido de um declínio pode ter resultado a liberação de toxinas no meio externo, após a morte da cianobactéria. O aumento da temperatura pode ser um fator importante para o aumento da produção de toxinas por cianobactérias (MOWE et al., 2015). Rangel et al. (2016) observaram que maiores concentrações de STX foram produzidas em temperatura de 32°C. A redução de cianotoxinas na água pode ser através da redução da biomassa de cianobactérias (NIMPTSCH et al., 2008) ou da absorção desses compostos por macrófitas. As plantas submersas são apontadas como Sistemas de Fígado Verde nos ecossistemas aquáticos por seu potencial de absorver e transformar substâncias tóxicas como metais e tóxicas (PFLUGMACHER et al., 2016; Amorim et al., 2017; Cao et al., 2019). No entanto, não podemos afirmar que *E. densa* absorveu as toxinas produzidas por *R. raciborskii*, pois não fizemos análises para observar o conteúdo de toxinas absorvidas.

Os resultados obtidos nesse estudo são fundamentais, visto que muitas espécies de cianobactérias, incluindo *R. raciborskii*, são bem adaptadas a ambientes com altas concentrações de nutrientes e temperaturas elevadas (HUISMAN et al., 2018). Os efeitos do aquecimento global decorrente das mudanças climáticas podem intensificar ainda mais as florações de cianobactérias em regiões tropicais, subtropicais e temperadas e aumentar a duração dessas florações e causar expansão geográfica e distribuição de cianobactérias em zonas temperadas (O'NEIL et al., 2012; SUKENIK et al., 2015; TAN et al., 2021; BONILLA et al., 2023). Encontrar métodos de controle para mitigar essas florações são essenciais. Métodos utilizando compostos químicos são amplamente estudados, mas a deficiência desses métodos são que muitos não são ecologicamente corretos, causando poluição secundária, liberação de cianotoxinas no ecossistema aquático e afetando outros organismos (LI et al., 2021; WANG et al., 2022). Diante disso, métodos de biocontrole utilizando macrófitas potencialmente produtoras de aleloquímicos podem ser eficazes para o controle dessas florações de cianobactérias tóxicas em ecossistemas eutrofizados.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados no presente estudo, podemos concluir que extratos e biomassa da macrófita submersa *Egeria densa* possui grande potencial para inibir o crescimento e a produção de biomassa da cianobactéria *Raphidopsis raciborskii* mesmo submetida a altas temperaturas e concentrações de nutrientes na água. A inibição de *R. raciborskii* pela macrófita pode ter sido causada por danos no aparato fotossintético, afetando a eficiência de fotossintética da cianobactéria, sugerindo o papel de interações envolvendo compostos alelopáticos. Apesar da redução da biomassa da cianobactéria em altas temperaturas, as concentrações de saxitoxina foram maiores, sugerindo que *R. raciborskii* se torna mais tóxica à medida que a temperatura aumenta. No mais, são necessários estudos que visem o isolamento e identificação dos compostos alelopáticos de *E. densa* e seus efeitos nos processos metabólicos e fisiológicos de cianobactérias e sua bioaplicação *in situ*. Nosso estudo ressalta a importância de planos de manejo e mitigação de florações de cianobactérias tóxicas em ecossistemas aquáticos submetidos à pressão antrópica da eutrofização artificial mediante cenários de intensificação do aquecimento global decorrente das mudanças climáticas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, C. A.; ULISSES, C.; MOURA, A. N. Biometric and physiological responses of *Egeria densa* Planch. cultivated with toxic and non-toxic strains of *Microcystis*. **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 201-208, 2017.
- AMORIM, C.A.; MOURA, A. N. Effects of the manipulation of submerged macrophytes, large zooplankton, and nutrients on a cyanobacterial bloom: A mesocosm study in a tropical shallow reservoir. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114997, 2020.
- ANTUNES, J. T.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 473, 2015.
- 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, p. 584-592, 2012.
- BARBOSA, V. V. et al. Can the presence of green microalgae reverse the allelopathic effects of the submerged macrophyte *Egeria densa* on the toxin-producing cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*?. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 19, p. 4391-4406, 2022.
- BARBOSA, V. V. et al. Influence of submerged macrophytes on phosphorus in a eutrophic reservoir in a semiarid region. **Journal of Limnology**, v. 79, n. 2, 2020.
- BENAYACHE, N.-Y. et al. An overview of cyanobacteria harmful algal bloom (CyanoHAB) issues in freshwater ecosystems. **Limnology-Some New Aspects of Inland Water Ecology**, p. 1-25, 2019.
- BICUDO, D. De C. et al. Undesirable side-effects of water hyacinth control in a shallow tropical reservoir. **Freshwater biology**, v. 52, n. 6, p. 1120-1133, 2007.
- BLÁHA, L.; BABICA, P.; MARSÁLEK, B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 2, p. 36, 2009.
- BONILLA, S. et al. Nutrients and not temperature are the key drivers for cyanobacterial biomass in the Americas. **Harmful Algae**, v. 121, p. 102367, 2023.
- BRASIL, J. et al. Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia**, v. 770, n. 1, p. 145-164, 2016.
- BRASIL, J. et al. Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia**, v. 770, p. 145-164, 2016.
- BURATTI, F. M. et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of toxicology**, v. 91, p. 1049-1130, 2017.
- BURFORD, M. A. et al. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Harmful Algae**, v. 54, p. 44-53, 2016.

- CAO, Q. et al. Bioaccumulation and detoxication of microcystin-LR in three submerged macrophytes: The important role of glutathione biosynthesis. **Chemosphere**, v. 225, p. 935-942, 2019.
- CAREY, C. C. et al. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1394-1407, 2012.
- CHAO, C. et al. Response of sediment and water microbial communities to submerged vegetations restoration in a shallow eutrophic lake. **Science of the Total Environment**, v. 801, p. 149701, 2021.
- CHEN, J. et al. The influence of aquatic macrophytes on *Microcystis aeruginosa* growth. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 130-133, 2012.
- CHONUDOMKUL, D. et al. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 3, p. 345-355, 2004.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. A guide to their public health consequences, monitoring and management. **Toxic cyanobacteria in water. WHO and E & SPON/Chapman & Hall, London**, 1999.
- CHORUS, I.; WELKER, M. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. Taylor & Francis, 2021.
- CHRISTENSEN, V. G.; KHAN, E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. **Science of the Total Environment**, v. 736, p. 139515, 2020.
- CHENG, L. et al. Comparative biotoxicity of N-Phenyl-1-naphthylamine and N-Phenyl-2-naphthylamine on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Chemosphere**, v. 176, p. 183-191, 2017.
- CODD, G. et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 4, p. 405-415, 1999.
- DALU, T.; WASSERMAN, R. J. Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables. **Science of the total environment**, v. 643, p. 835-841, 2018.
- DOS SANTOS SILVA, R. D. et al. Synergistic effects of temperature and nutrients on growth and saxitoxin content of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 2, p. 941-952, 2022.
- DOKULIL, M. T. Vegetative survival of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) at low temperature and low light. **Hydrobiologia**, v. 764, n. 1, p. 241-247, 2016.

DONG, J. et al. Response of submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* to the exponential phase (EP) and declining phase (DP) of toxic *Microcystis aeruginosa*. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 16, p. 3581-3596, 2022.

DOS SANTOS SILVA, R. D. et al. Synergistic effects of temperature and nutrients on growth and saxitoxin content of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 2, p. 941-952, 2022.

ERHARD, D.; GROSS, E. M. Do environmental factors influence composition of potential allelochemicals in the submerged freshwater macrophyte *Elodea nuttallii* (Hydrocharitaceae)?. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 29, n. 1, p. 287-291, 2005.

ESPINOSA-RODRIGUEZ, C. A. et al. Allelopathic interactions between the macrophyte *Egeria densa* and plankton (alga, *Scenedesmus acutus* and cladocerans, *Simocephalus* spp.): a laboratory study. **Journal of Limnology**, v. 75, 2016.

ESPINOSA-RODRÍGUEZ, C. A.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Zooplankton community changes in relation to different macrophyte species: effects of *Egeria densa* removal. **Ecology & Hydrobiology**, v. 21, n. 1, p. 153-163, 2021.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; DA SILVA, D. A. C. Saxitoxin-producing *Raphidiopsis raciborskii* (cyanobacteria) inhibits swimming and physiological parameters in *Daphnia similis*. **Science of the Total Environment**, v. 706, p. 135751, 2020.

FERREIRA, T. F. et al. The structuring role of submerged macrophytes in a large subtropical shallow lake: Clear effects on water chemistry and phytoplankton structure community along a vegetated-pelagic gradient. **Limnologica**, v. 69, p. 142-154, 2018.

FIGUEREDO, Cleber C.; GIANI, Alessandra; BIRD, David F. Does allelopathy contribute to *cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? 1. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 256-265, 2007.

GARCÍA, J. Ecological engineering practice as a global strategy to prevent eutrophication and microalgae blooms. **Ecological Engineering**, v. 161, p. 106152, 2021.

GAO, Y. N. et al. Allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton. **Allelopathy J**, v. 40, n. 1, p. 1-22, 2017.

GAO, Y. N. et al. Enhanced toxicity to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by low-dosage repeated exposure to the allelochemical N-phenyl-1-naphthylamine. **Chemosphere**, v. 174, p. 732-738, 2017b.

GE, F. J. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus levels on the growth and total phenolic contents of *Myriophyllum spicatum*. **Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 32, n. 2, p. 472-479, 2012b.

GE, F. J. et al. Effects of light intensity on growth and phenolic contents of *Myriophyllum spicatum*. **Environ. Sci. Technol**, v. 35, p. 30-34, 2012a.

- GIANNUZZI, L. et al. Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 189, p. 22-30, 2016.
- GRIFFITHS, D.J.; SAKER, M. L. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 18, n. 2, p. 78-93, 2003.
- GROSS, E. M. et al. Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. **Hydrobiologia**, v. 584, p. 77-88, 2007.
- HAANDE, S. et al. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful algae**, v. 7, n. 5, p. 692-701, 2008.
- HÄDER, D.-P.; BARNES, P. W. Comparing the impacts of climate change on the responses and linkages between terrestrial and aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 682, p. 239-246, 2019.
- HAN, J. et al. Growth inhibition and oxidative damage of *Microcystis aeruginosa* induced by aqueous extract of different submerged macrophytes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 38, p. 53224-53238, 2021.
- HILT, S.; GROSS, E. M. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes?. **Basic and applied ecology**, v. 9, n. 4, p. 422-432, 2008.
- HOLLAND, A.; KINNEAR, S. Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide?. **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2239-2258, 2013.
- HONG, W. X. et al. Asymmetric warming enhances *Microcystis aeruginosa* resistance to macrophytic anti-cyanobacterial coumarin. **Allelopathy Journal**, v. 43, n. 2, p. 265-274, 2018.
- HUANG, H. et al. Effects of natural flavonoids on photosynthetic activity and cell integrity in *Microcystis aeruginosa*. **Toxins**, v. 7, n. 1, p. 66-80, 2015.
- HUANG, I.-S.; ZIMBA, Paul V. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. **Harmful algae**, v. 86, p. 139-209, 2019.
- HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 471-483, 2018.
- IWINSKI, K. J. et al. Cellular and aqueous microcystin-LR following laboratory exposures of *Microcystis aeruginosa* to copper algaecides. **Chemosphere**, v. 147, p. 74-81, 2016.
- JANČULA, D.; MARŠÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. **Chemosphere**, v. 85, n. 9, p. 1415-1422, 2011.

- JEPPESEN, E. et al. Climate change effects on runoff, catchment phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. **Journal of environmental quality**, v. 38, n. 5, p. 1930-1941, 2009.
- JEPPESEN, E. et al. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. **Hydrobiologia**, v. 750, n. 1, p. 201-227, 2015.
- JIA, N. et al. Interspecific competition reveals *Raphidiopsis raciborskii* as a more successful invader than *Microcystis aeruginosa*. **Harmful algae**, v. 97, p. 101858, 2020.
- JIANG, X. et al. Rapid evolution of tolerance to toxic *Microcystis* in two cladoceran grazers. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2016.
- JOEHNK, K. D. et al. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global change biology**, v. 14, n. 3, p. 495-512, 2008.
- KOKOCIŃSKI, M. et al. Distribution of invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* in the East-Central Europe is driven by climatic and local environmental variables. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 4, p. fix035, 2017.
- LEGRAND, C. et al. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 406-419, 2003.
- LE MOAL, M. et al. Eutrophication: a new wine in an old bottle?. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1-11, 2019.
- LEI, Z. et al. Recent advances in nanomaterials-based optical and electrochemical aptasensors for detection of cyanotoxins. **Talanta**, p. 123607, 2022.
- LI, B. et al. A review: application of allelochemicals in water ecological restoration——algal inhibition. **Chemosphere**, v. 267, p. 128869, 2021.
- LIN, S.; LITAKER, R. Wayne; S., William G. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 52, n. 1, p. 10-36, 2016.
- LÜRLING, M. et al. Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. **Ecological Engineering**, v. 158, p. 106032, 2020.
- MALDENER, I.; SUMMERS, M. L.; SUKENIK, A. Cellular differentiation in filamentous cyanobacteria. **The cell biology of cyanobacteria**, v. 15, p. 263-291, 2014.
- MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, v. 59, p. 303-327, 2013.
- MERIGGI, C. et al. Species distribution models as a tool for early detection of the invasive *Raphidiopsis raciborskii* in European lakes. **Harmful Algae**, v. 113, p. 102202, 2022.

MOHAMED, Z. A. Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management—A review. **Limnologica**, v. 63, p. 122-132, 2017.

MOHAMED, Z. A. Breakthrough of *Oscillatoria limnetica* and microcystin toxins into drinking water treatment plants-examples from the Nile River, Egypt. **Water SA**, v. 42, n. 1, p. 161-165, 2016.

MOHAMED, Z. A. et al. Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile River, Egypt: implication for water treatment and human health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 15, p. 11716-11727, 2015.

MONCHAMP, M.-E. et al. Homogenization of lake cyanobacterial communities over a century of climate change and eutrophication. **Nature ecology & evolution**, v. 2, n. 2, p. 317-324, 2018.

MOWE, M. AD et al. Comparative study of six emergent macrophyte species for controlling cyanobacterial blooms in a tropical reservoir. **Ecological Engineering**, v. 129, p. 11-21, 2019.

MOWE, M. AD et al. Rising temperatures may increase growth rates and microcystin production in tropical *Microcystis* species. **Harmful Algae**, v. 50, p. 88-98, 2015.

NAKAI, S. et al. Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 5, p. 993-999, 2012.

NAKAI, S. et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 47-53, 1999.

NAKAI, S. et al. Growth inhibition of *Microcystis aeruginosa* by allelopathic compounds originally isolated from *Myriophyllum spicatum*: temperature and light effects and evidence of possible major mechanisms. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 47, n. 6, p. 488-493, 2014.

NI, L. et al. Inhibitory effect and mechanism of linoleic acid sustained-release microspheres on *Microcystis aeruginosa* at different growth phases. **Chemosphere**, v. 212, p. 654-661, 2018.

NIMPTSCH, J.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Cyanobacterial toxin elimination via bioaccumulation of MC-LR in aquatic macrophytes: An application of the “Green Liver Concept”. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 22, p. 8552-8557, 2008.

O’NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful algae**, v. 14, p. 313-334, 2012.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental microbiology reports**, v. 1, n. 1, p. 27-37, 2009.

- PAERL, H. W.; OTTEN, Timothy G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial ecology**, v. 65, p. 995-1010, 2013.
- PEARSON, L. A. et al. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. **Harmful Algae**, v. 54, p. 98-111, 2016.
- PFLUGMACHER, S. et al. Physiological responses of *Cladophora glomerata* to cyanotoxins: A potential new phytoremediation species for the Green Liver Systems. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 241-259, 2016.
- PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 17, n. 4, p. 407-413, 2002.
- PICCINI, C. et al. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. **Harmful Algae**, v. 10, n. 6, p. 644-653, 2011.
- RANGEL, L. M. et al. Toxicity overrides morphology on *Cylindrospermopsis raciborskii* grazing resistance to the calanoid copepod *Eudiaptomus gracilis*. **Microbial ecology**, v. 71, p. 835-844, 2016.
- RICHARDSON, J. et al. Response of cyanobacteria and phytoplankton abundance to warming, extreme rainfall events and nutrient enrichment. **Global Change Biology**, v. 25, n. 10, p. 3365-3380, 2019.
- 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**, v. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.
- SENAVIRATHNA, M. D. H. J. et al. *Egeria densa* allelopathy on *microcystis aeruginosa* under different light intensities and preliminary insight into inter-parameter relationships. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, p. 1-13, 2021.
- SENAVIRATHNA, M. D. H. J. et al. *Egeria densa* allelopathy on *microcystis aeruginosa* under different light intensities and preliminary insight into inter-parameter relationships. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, p. 1-13, 2021.
- SINHA, E.; MICHALAK, A. M.; BALAJI, V. Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes. **Science**, v. 357, n. 6349, p. 405-408, 2017.
- SINHA, R. et al. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones—is climate change responsible?. **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1408-1419, 2012.
- ŚLIWIŃSKA-WILCZEWSKA, S. et al. The current state of knowledge on taxonomy, modulating factors, ecological roles, and mode of action of phytoplankton allelochemicals. **Science of the Total Environment**, v. 773, p. 145681, 2021.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**, v. 1, p. 43-112, 1999.

SUKENIK, A.; QUESADA, A.; SALMASO, N. Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 889-908, 2015.

SUKENIK, A. et al. Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes—physiological, regional, and global driving forces. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 86, 2012.

TARANU, Z. E. et al. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. **Ecology letters**, v. 18, n. 4, p. 375-384, 2015.

TAN, F. et al. Precision early detection of invasive and toxic cyanobacteria: A case study of *Raphidiopsis raciborskii*. **Harmful Algae**, v. 110, p. 102125, 2021.

TESTAI, E. et al. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. **Critical reviews in toxicology**, v. 46, n. 5, p. 385-419, 2016.

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

VAN DONK, E.; VAN DE BUND, W. J. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. **Aquatic botany**, v. 72, n. 3-4, p. 261-274, 2002.

VANDERSTUKKEN, M. et al. Biological control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes *Egeria densa* and *Potamogeton illinoensis*: a mesocosm study. **Freshwater Biology**, v. 56, n. 9, p. 1837-1849, 2011.

VANDERSTUKKEN, M. et al. Long-term allelopathic control of phytoplankton by the submerged macrophyte *E. lodea nuttallii*. **Freshwater Biology**, v. 59, n. 5, p. 930-941, 2014. 4

VICO, P. et al. Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 148, p. 106824, 2020.

WALLS, J. T. et al. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, v. 610, p. 786-795, 2018.

WANG, D. et al. Research Status on Remediation of Eutrophic Water by Submerged Macrophytes: A Review. **Process Safety and Environmental Protection**, 2022.

WANG, R. et al. Evaluating the effects of allelochemical ferulic acid on *Microcystis aeruginosa* by pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry and flow cytometry. **Chemosphere**, v. 147, p. 264-271, 2016.

- WANG, J.; SOININEN, J.; HEINO, J.. Ecological indicators for aquatic biodiversity, ecosystem functions, human activities and climate change. **Ecological Indicators**, v. 132, p. 108250, 2021.
- WERALUPITIYA, C. et al. Cyanotoxins uptake and accumulation in crops: Phytotoxicity and implications on human health. **Toxicon**, 2022.
- WIESE, M. et al. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. **Marine drugs**, v. 8, n. 7, p. 2185-2211, 2010.
- WOOD, S. A.; STIRLING, D. J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 37, n. 4, p. 821-828, 2003.
- WOOLWAY, R. I. et al. Lake heatwaves under climate change. **Nature**, v. 589, n. 7842, p. 402-407, 2021.
- WU, Z. B. et al. Allelopathy of Aquatic Macrophytes on Phytoplankton. 2016.
- WU, Z.; SHI, J.; YANG, S. The effect of pyrogallol acid on growth, oxidative stress, and gene expression in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Ecotoxicology**, v. 22, p. 271-278, 2013.
- YAN, D. et al. Responses of cyanobacteria to climate and human activities at Lake Chenghai over the past 100 years. **Ecological indicators**, v. 104, p. 755-763, 2019.
- YANG, Y. et al. Toxicity-associated changes in the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to nitrogen fluctuations. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 1041-1049, 2018.
- XIAO, M.; WILLIS, A.; BURFORD, M. A. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. **Harmful Algae**, v. 62, p. 84-93, 2017.
- ZHAO, Y. et al. Effects of nitrogen to phosphorus ratios on algal growth and arsenate metabolism by *Microcystis aeruginosa* with dissolved organic phosphorus and nitrate as nutrients. **Algal Research**, v. 69, p. 102922, 2023.
- ZHAO, Y. et al. Microbial community and removal of nitrogen via the addition of a carrier in a pilot-scale duckweed-based wastewater treatment system. **Bioresource technology**, v. 179, p. 549-558, 2015.
- ZHOU, L. et al. Research advance in allelopathy effect and mechanism of terrestrial plants in inhibition of *Microcystis aeruginosa*. **Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology**, v. 29, n. 5, p. 1715-1724, 2018.
- ZHOU, Y. et al. Reproduction capacity of *Potamogeton crispus* fragments and its role in water purification and algae inhibition in eutrophic lakes. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 1421-1428, 2017.

ZHU, J. et al. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 196-203, 2010.

ZHU, X. et al. A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123403, 2021.

ZUO, S. et al. Allelopathy appraisal of worm metabolites in the synergistic effect between *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Potamogeton malaianus* on algal suppression. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109482, 2019.