

APLICABILIDADE DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS AUTOMATIZADO NO ESTUDO DA ALELOPATIA EM CIANOBACTÉRIAS DE ÁGUA DOCE

Nome do Autor Principal⁽¹⁾

Beatriz Brito Viana, Bióloga, Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial pela Sociedade Brasileira de Microbiologia

Nome do Autor⁽²⁾

Ligia Marino, Bióloga, Especialista em Gestão Ambiental pela Universidade de São Paulo; Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial pela Sociedade Brasileira de Microbiologia

Endereço⁽¹⁾: Rua Barueri, 564 – Jd. Dom José – Embu das Artes - SP - CEP: 06824-030 - Brasil - Tel: +55 (11) 98735-1186 - e-mail: bbviana@sabesp.com.br

RESUMO

A alelopatia desempenha importante papel na ecologia das cianobactérias, ativando ou inibindo o crescimento e a produção de aleloquímicos, pelas interações entre praticamente todos os grupos presentes nos sistemas aquáticos: cianobactérias, microalgas, zooplâncton e macrófitas. Dentre estes grupos, as maiores interações com resposta ocorrem entre cianobactérias e macrófitas. Fatores como temperatura, pH, nutrientes, degradação e taxa de misturas interferem no resultado das interações alelopáticas. As cianobactérias produtoras de cianotoxinas são mais competentes para sobreviver em condições adversas e obtêm vantagem nas interações. As espécies com maior potencial alelopático são *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii* e obtêm vantagem em grande parte das interações com outros grupos, pelos aleloquímicos produzidos. Ainda assim, quando em competição, *Raphidiopsis raciborskii* supera *Microcystis aeruginosa*. Dentre as picocianobactérias, o gênero *Synechococcus* possui grande resistência e potencial alelopático inibitório sobre a maioria dos grupos fitoplanctônicos, inclusive outras cianobactérias. As cianotoxinas desempenham um papel de aleloquímico. A avaliação preliminar evidenciou a possibilidade de aplicação do Sistema de Análise de Imagens Automatizado Flowcam para estudo da alelopatia em cianobactérias, a partir de uma abordagem morfológica.

PALAVRAS-CHAVE: Alelopática. Cianobactéria. Aleloquímico

INTRODUÇÃO

Alelopatia é um fenômeno biológico pelo qual um organismo produz um ou mais compostos bioquímicos que influenciam a germinação, crescimento, sobrevivência e reprodução de outros organismos da mesma comunidade (Mello et al. 2012; Yunes 2019). Uma espécie que produz compostos alelopáticos terá vantagem sobre seus concorrentes. Pode ser o resultado de uma seleção direta do metabolismo secundário ou um processo secundário em que a biossíntese de moléculas foi originalmente selecionada para outros fins (Leflaive and Ten-Hage 2007). É uma característica de certas plantas, bactérias, corais, fungos e microalgas.

Pode ser definido também como o efeito direto ou indireto prejudicial ou benéfico de uma planta sobre outra por meio da liberação de compostos lançados no meio ambiente, promovendo a interação química entre os micro-organismos e estabelecendo uma comunicação (Leflaive and Ten-Hage 2007).

Os produtos da alelopatia são conhecidos como aleloquímicos, metabólitos secundários, que podem ter efeitos benéficos (probiotes) ou prejudiciais (antibiotés) nos organismos-alvo e na comunidade. Entre os aleloquímicos conhecidos estão vários metabólitos extracelulares, incluindo polissacarídeos, compostos de nitrogênio e proteínas (Yunes 2019).

Metabólitos secundários são aqueles compostos não utilizados por um organismo para o metabolismo primário. Além dos aleloquímicos, hormônios e antibióticos são exemplos de metabólitos secundários. A formação desses

compostos está sujeita ao controle fisiológico geral que, por sua vez, responde a fatores ambientais (Śliwińska-Wilczewska et al. 2018); (Holland and Kinnear 2013).

Os aleloquímicos não são imprescindíveis ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, mas conferem uma característica importante na defesa das algas contra a herbivoria e exercem um efeito direto ou indireto sobre a biota circundante, influenciando seu crescimento, fisiologia ou comportamento (Dias et al. 2017). Alguns aleloquímicos que apresentam toxicidade aguda contra animais são agrupados sob o termo “toxina” (Leflaive and Ten-Hage 2007).

O potencial dos compostos produzidos como resposta alelopática, depende principalmente da identificação do organismo alvo e o tipo de resposta. A resposta pode ser de inibição ou estimulação do crescimento, ou inibição ou estimulação de metabólitos pelo organismo alvo. As cianobactérias, onipresentes na zona fótica dos ecossistemas aquáticos, estão entre os organismos capazes de exibir propriedades alelopáticas (Dias et al. 2017).

As interações alelopáticas são um fator importante na determinação da distribuição e abundância de espécies nas comunidades vegetais e também são consideradas importantes para o sucesso de muitas plantas invasoras. Dentro de uma população de fitoplâncton estudada, os efeitos alelopáticos das probioses e antibioses interagem decisivamente na determinação de uma sequência de florescimento. Vários casos foram bem descritos, nos quais a sucessão de algas e a formação de florações estão relacionadas à produção de compostos alelopáticos (Leflaive and Ten-Hage 2007).

As cianobactérias são procariotos aquáticos fototróficos, altamente adaptáveis a uma grande variedade de ambientes, incluindo ambientes extremos, porém mais comuns em ambientes aquáticos. Em condições físico-químicas favoráveis podem se proliferar muito rapidamente formando grandes massas celulares conhecidas como “florações”. Quando elas ocorrem, os metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias de água doce podem atingir alta concentração no ambiente aquático e alguns deles possuem propriedades alelopáticas (Y. Wu et al. 2011).

As cianobactérias que foram sugeridas como ameaças à saúde humana e ambiental em todo o mundo e também possuem um potencial considerável para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e outras aplicações biomédicas (Gantar et al. 2008) podem produzir uma grande variedade de metabólitos secundários. Muitos desses compostos apresentam atividade antialgal, antibiótica, antifúngica, antiviral e inibidora de enzimas (Sharma et al. 2011).

Metabólitos de cianobactérias abrangem uma ampla variedade de classes químicas, particularmente incluindo uma diversidade de alcalóides e peptídeos ricos em nitrogênio (Berry et al. 2008), porém o papel da maioria destes metabólitos é relativamente desconhecido. A hipótese é a de que constituem defesa química contra herbivoria e vantagem na competição das cianobactérias por recursos com outros organismos, como algas macrófitas e outros micro-organismos presentes no plâncton.

Alguns dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias são provenientes de atividade alelopática, conferindo a este grupo a condição de um dos maiores produtores de aleloquímicos e toxinas (B-Béres et al. 2015), constituídas por compostos aromáticos clorados, peptídeos cíclicos e não cíclicos, policetídeos, alcaloides, ácidos graxos. Alguns exemplos incluem as microcistinas, saxitoxinas, cilindrospermospsinas e anatoxinas (B-Béres et al. 2015).

A maior ocorrência onde metabólitos secundários de florações de cianobactérias em sistemas hídricos causaram danos à saúde humana ocorreu em uma clínica de hemodiálise em Caruaru no estado de Pernambuco em fevereiro de 1996. Esse evento ficou conhecido mundialmente como “Surto de Caruaru”, no qual 132 pacientes foram contaminados com hepatotoxinas de cianobactérias, e 52 pacientes vieram a óbito devido a síndrome causada pela intoxicação (Yunes, 2019).

Desde então, o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas é regulamentado pelo anexo XX da portaria de consolidação nº 5 do ministério da saúde de 03 de outubro de 2017, que estabelece critérios mínimos, frequência de amostragem e ensaios nas captações de tratamento para determinar a concentração de células e a produção de cianotoxinas.

Cada vez mais, tem sido um grande desafio para os gestores de sistemas hídricos de empresas de tratamento de água monitorar os reservatórios para evitar ocorrências de florações de cianobactérias e a produção de cianotoxinas, garantindo tomadas de decisões rápidas. No entanto, não é possível prever uma floração de cianobactérias, porque as amostragens evidenciam “o passado” de uma água possivelmente já tratada e distribuída.

O conhecimento sobre alelopatia de cianobactérias aplicado ao monitoramento já realizado pelas companhias de saneamento básico permitiria inferir sobre as interações alelopáticas, se ativam ou inibem a produção de cianotoxinas, porque são produzidas, e o mais importante, prever o comportamento dessas interações. Uma compilação do conhecimento científico sobre esse tema atualizada pode ser uma ferramenta de consulta e análise dos dados pelos gestores de mananciais.

O ensaio de identificação e contagem de cianobactérias realizado rotineiramente no monitoramento resulta em um relatório extremamente rico em informações, contendo os gêneros de cianobactérias e densidade, porém apenas a informação do total de células é usada para tomada de decisões. O hidrobiólogo é o profissional capacitado em realizar os ensaios que fornecem essas informações. Seu treinamento é complexo e exige dedicação e profundo estudo, e talvez por isso não existam muitos profissionais capacitados a realizar tal ensaio.

Recentemente uma tecnologia derivada da combinação de citometria de fluxo, microscopia e fluorescência tem sido empregada para auxiliar os estudos em ficologia e auxiliado em atividades de gestão de recursos hídricos. O sistema de análise de imagens automatizada tem sido empregado também no estudo em alelopatia. (Poulton, 2016)

Este trabalho priorizou revisar as interações alelopáticas dos gêneros de cianobactérias mais frequentes e problemáticos, como *Microcystis* e *Raphidiopsis*, e um gênero emergente, a picocianobactéria *Synechococcus*. Quanto à produção de aleloquímicos, abordaremos principalmente sobre a produção de cianotoxinas.

A partir deste contexto questiona-se: Quais as interações alelopáticas realizadas pelas cianobactérias? Seria possível aplicar o método automatizado de análise e captura de imagens, para determinação de cianobactérias nesses sistemas hídricos de modo a obter-se informações para o estudo das interações alelopáticas?

OBJETIVOS

O objetivo primário deste trabalho será avaliar de modo preliminar a aplicabilidade do Sistema de Análise de Imagens Automatizado no estudo da alelopatia.

O objetivo secundário foi reunir e organizar o conhecimento exposto na literatura recente sobre a atividade alelopática de cianobactérias nos sistemas hídricos, de forma a contribuir para a gestão de mananciais.

Para isso, os seguintes subtemas foram abordados: (a) fatores bióticos e abióticos que modulam a produção de aleloquímicos e os mecanismos celulares de ativação dessa produção e; (b) interações alelopáticas entre as principais cianobactérias formadoras de florações e potencialmente produtoras de cianotoxinas.

Subsidiar uma análise consistente do comportamento de sistemas hídricos pela composição do conhecimento presente na literatura científica junto as informações geradas pelo Sistema de Análise de Imagens Automatizado.

METODOLOGIA

O trabalho desenvolvido segue os preceitos de estudo exploratório. As consultas foram realizadas na base de dados do Google Scholar, por permitir a pesquisa por relevância, no período de pesquisa: 2006 a 2019.

Foram realizadas pesquisas combinadas com palavras chaves em português e inglês (?): “Alelopatia”, “Aleloquímicos”, “Cianobactéria”, “Microcystis”, “*Raphidiopsis*”, “*Dolichospermum*”, “Cianotoxinas”, “Microcistina”, “Cilindrospermopsina”, “Saxitoxina”, “anatoxina” e “Estresse”.

Foram encontrados e recuperados 82 artigos, dos quais 72 serviram como fontes de pesquisa para este trabalho.

As combinações de pesquisas mais representativas foram:

“Alelopathy”, “Allelochemical” e “*Microcystis*” – 59 artigos.

“Alelopathy”, “Allelochemical” e “*Anabaena* – 47 artigos.e “Alelopatia”, e“Aleloquímicos” e “*Dolichospermum*” -5 artigos. (Como o gênero *Anabaena* foi reclassificado para *Dolichospermum*, grande parte dos artigos sobre este gênero estão com a antiga classificação)

“Alelopathy”, “Allelochemical” e “*Raphidiopsis*” – 35 artigos.

“Alelopathy”, “Allelochemical” e “Cianotoxinas – 30 artigos.

Idioma – Apenas 2 publicações estão em língua portuguesa, os demais artigos pesquisados foram publicados em língua inglesa. Os artigos foram publicados por jornais internacionais, das áreas de Microbiologia, Plâncton, Ficologia, Limnologia, Gerenciamento Ambiental e Toxicologia. Após a coleta de dados, foi realizada a leitura de todo o material, e seleção do conteúdo pertinente. Em seguida o conteúdo foi separado em (2) grupos:

Assuntos gerais – Ecologia e métodos

Alelopatia por Interação entre microrganismos - classificado de acordo com o gênero de cianobactéria e em seguida por interações.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Alelopatia em cianobactérias

O potencial alelopático das cianobactérias foi revelado pela primeira vez pelo trabalho de Keating na década de 1970. Em um lago de água doce, foi demonstrada a capacidade de filtrados sem células das cianobactérias dominantes, bem como da água do lago, de induzir efeitos positivos ou negativos no crescimento de outras cianobactérias e diatomáceas do mesmo lago. Além disso, esses estudos mostraram que essas interações alelopáticas estavam correlacionadas à sucessão de florações de algas nesse lago (Leão et al. 2012). A primeira pesquisa mais intensiva sobre as propriedades alelopáticas de cianobactérias foram iniciadas na década de 80, com a caracterização dos aleloquímicos produzidos pela cianobactéria *Scytonema hofmanii* (Mason et al., 1982; Pignatello et al., 1983; Moore et al., 1984).

As cianobactérias são uma fonte prolífica de quase 800 metabólitos secundários bioativos diversos, originados principalmente da peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS) ou da biossíntese mista de policetídeo sintase (PKS) NRPS (Leão, Vasconcelos, and Vasconcelos 2009b).

Seu domínio após o crescimento explosivo em certos ecossistemas de água doce foi atribuído em parte à capacidade de liberar aleloquímicos para o meio circundante, inibindo o crescimento de outros grupos de fitoplâncton (Bittencourt-Oliveira et al. 2016).

Vários gêneros são descritos como alelopáticos ou potencialmente alelopáticos como: *Anabaena*; *Calothrix*; *Gomphosphaeria*, *Aphanizomenon*, *Hapalosiphon*, *Fischerella*, *Microcystis*; *Nodularia*; *Nostoc*; *Oscillalloria*; *Phormidium*; *Scytonema* e *Trichormus* (Erhard 2006; Legrand et al. 2003); *Leptolyngbya* e *Raphidiopsis* (Figueredo et al., 2007).

Alguns aleloquímicos ou potentes aleloquímicos essenciais de cianobactérias foram identificados como compostos aromáticos clorados, cíclicos e não cíclicos peptídeos, policetídeos, alcalóides e ácidos graxos (Leão et al. 2009).

As funções estabelecidas até hoje para os metabólitos secundários de cianobactérias incluem armazenamento de nitrogênio, proteção UV, quelação de metais, defesa contra predação e detecção de quórum (Leão et al. 2010)(Berry et al. 2008).

Foi relatado que os aleloquímicos produzidos por cianobactérias têm um papel ecológico, interferindo na sucessão fitoplanctônica, na formação de florações, na competição por recursos, interferências e aptidão invasiva e dominância através de interações aleloquímicas, inibindo o crescimento de outros fitoplânctons (Leão et al.

2010; Leflaive and Ten-Hage 2007). A atividade alelopática é aumentada, quando as condições ambientais são abaixo do ideal, desencadeando estresse ambiental, aumentando a produção de compostos alelopáticos ou tornando o micro-organismo um alvo suscetível (Leflaive and Ten-Hage 2007).

1.1. Modo de ação dos aleloquímicos

Inibição da fotossíntese - A inibição do crescimento e, eventualmente, a morte por inibição da fotossíntese é um modo de ação bastante difundido para as cianobactérias. Os compostos alelopáticos cianobacterianos são geralmente solúveis em solventes orgânicos, insolúveis em água e tem um baixo peso molecular. Essas propriedades os ajudam a alcançar as membranas tilacóides onde ocorre a fotossíntese (Leflaive and Ten-Hage 2007).

Inibição enzimática - Muitos organismos aquáticos produzem enzimas extracelulares essenciais para a nutrição. Cerca de 20% das cianobactérias isoladas de biofilmes de água doce são capazes de inibir a atividade da α -glucosidase. Este pode ser um meio para inibir a hidrólise da mucilagem produzida pelas cianobactérias (Leflaive and Ten-Hage 2007).

Paralisia celular - A cianobactéria *Anabaena flos-aquae* pode induzir paralisia e, portanto, um estabelecimento mais rápido das células da alga verde móvel concorrente *Chlamydomonas reinhardtii* (Leflaive and Ten-Hage 2007).

Inibição da síntese de ácidos nucleicos - Dois alcalóides isolados de *Fischerella* sp.(12-epi-hapalindol E) e *Calothrix* sp. (calotrixina A) exibem uma atividade inibidora direcionada contra a RNA polimerase de bactérias, fungos e algas verdes. Esta atividade é fortemente dependente da concentração de polimerase e leva à inibição do crescimento devido à inibição da síntese de proteínas. A calotrixina A também inibe a síntese de DNA (Gantar et al. 2008)(Shao et al. 2013).

1.2. Fatores bióticos e abióticos

A produção de um aleloquímico pode ser estimulada ou minimizada por vários fatores bióticos e abióticos (E Granéli et al. 2006; Mello et al. 2012).

1.2.1. Fatores bióticos

Degradação - bactérias heterotróficas coexistentes que degradam substâncias aleloquímicas foram identificadas entre os fatores bióticos, interferindo na persistência dos aleloquímicos no ambiente natural. A cianotoxina microcistina é suscetível à degradação por bactérias: a atividade de bactérias degradadoras diminuíram a concentração de microcistina do meio de cultura, causando a inibição da atividade alelopática esperada neste ensaio e manutenção do tamanho das colônias de *Microcystis*. Neste caso a microcistina teria participação no aumento do tamanho das colônias de *Microcystis*, porém com a degradação da toxina, observou-se a diminuição drástica do tamanho das colônias (Gan et al. 2012; H. Ma et al. 2015).

Competição - Presença de concorrentes pode causar estresse abiótico, desencadeando mecanismos de defesa e ativando vias metabólicas. No entanto, a coexistência entre micro-organismos em longo prazo no mesmo habitat pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de adaptação entre si, e a um composto alelopático. Já no ambiente aquático com uma comunidade complexa e a presença de espécies diferentes, algumas permanecerão sensíveis ao composto (Leflaive, 2007).

Interações alelopáticas que não são detectáveis devido à adaptação podem se tornar evidentes sob estresse físico-químico. Em condições de luz, nutrientes ou espaço limitado, a produção de um composto alelopático pode ser aumentada enquanto o alvo pode se tornar mais sensível ((Barreiro Felpeto et al. 2018).

1.2.1. Fatores abióticos

Baixa taxa de mistura da coluna d'água – a baixa taxa de mistura pode ser considerada um fator abiótico, por favorecer a atividade dos aleloquímicos e, assim, a concentração desses compostos. Além disso, favorece a competição entre bactérias heterotróficas que não degradam os aleloquímicos e as capazes de degradá-los (Leão, Vasconcelos, and Vasconcelos 2009b).

pH - é possível que os compostos exsudados exibam atividade alelopática em faixas específicas de pH; portanto, o pH não deve ser considerado como um fator independente para os aleloquímicos. Meios de cultura com baixos valores de pH (pH em torno de 6,0), podem ser um fator repressor de atividade alelopática (Mello et al. 2012). No caso de *Oscillatoria laetevirens* verificou-se que a produção de potenciais aleloquímicos aumentou quatro vezes quando o pH do meio de crescimento inicial aumentou de pH 8 para valores acima de 9 (Leão et al. 2009).

Metais - As cianobactérias podem produzir aleloquímicos capazes de capturar metais traço essenciais no ambiente aquático, tornando-o biodisponível (Dias et al. 2017). Foram descritos ligantes de cobre (Cu), cobalto (Co), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (Leão et al. 2009).

Nutrientes- A baixa quantidade de nutrientes pode desencadear uma resposta de estresse e ativação de produção de aleloquímicos que conferem vantagem competitiva para captura dos nutrientes disponíveis. Condições de baixa concentração de nutrientes, como fosfato e magnésio, desencadeiam o aumento da produção de potenciais aleloquímicos *Oscillatoria laetevirens*. A produção de exometabólitos com atividade antimicrobiana, 4,4-di-hidroxibifenil e Norharmane, por *Nostoc insulare* ocorre somente em fase estacionária e em ambientes com privação de nutrientes (Leao, 2009). Aparentemente esses compostos estão relacionados respostas alelopáticas para inibir competidores por nutrientes (C. A. Weirich, Robertson, and Miller 2019).

Intensidade de luz - altas intensidades de luz podem atuar como um fator repressor de alelopatia (Mello et al. 2012).

Em síntese, dentre os fatores abióticos mais importantes que aumentam e estimulam a alelopatia estão (Mello et al. 2012) (Figura 1):

1. deficiência de nutrientes, como nitrogênio e compostos de fósforo no meio de cultura;
2. baixas intensidades de luz;
3. baixas temperaturas;
4. meio de cultura com pH alto (cerca de 9,0).

Consequentemente, os fatores abióticos que atuam como repressores da alelopatia são (Mello et al. 2012):

1. altas intensidades de luz;
2. altas temperaturas;
3. nutrientes em excesso no meio de cultura (nitrogênio e fósforo);
4. meio de cultura com baixos valores de pH (pH em torno de 6,0).

1.3. Métodos de estudo de alelopatia

A pesquisa sobre alelopatia em ambientes aquáticos é focada: (1) na demonstração da produção de compostos alelopáticos por um organismo;(2) na compreensão de fatores permanentes que influenciam a produção; (3) na identificação e caracterização dos compostos e sua via de biossíntese; e (4) na estimativa do papel e da importância dos alelopáticos em interações no campo (Leflaive and Ten-Hage 2007).

Existem diferentes tipos de interações envolvendo compostos aleloquímicos e os principais estudos de alelopatia são iniciados determinando o organismo produtor (alelopático) e um organismo alvo (sensível). Nos estudos de alelopatia consultados para a elaboração desta revisão, os métodos empregados foram baseados essencialmente em ensaios com culturas, empregando meios sólidos ou líquidos. Os principais desenhos experimentais utilizados foram (Dias et al. 2017):

- a. **Monoculturas** - Preparação das culturas com os organismos separados para avaliar o comportamento sem o interferente de competição e permitindo que os organismos se desenvolvam sem pressões e estresse.
- b. **Culturas cruzadas** - Paralelamente, as culturas são cruzadas com as células do organismo competidor. Neste tipo de cultura além da interação entre micro-organismos é avaliado o fator “competição”, principalmente em relação aos nutrientes.
- c. **Adição de filtrados**, extratos brutos da cultura adversária com ou sem células. Na sua maioria os ensaios são realizados com extratos filtrados sem células, permitindo a observação dos efeitos dos compostos sem o interferente de competição pelos nutrientes presentes no meio de cultura, ou ainda adicionando um composto isolado ao meio de cultura para avaliar o efeito da atividade específica.

d. Adição de extratos filtrados com resíduos de células – apesar de pouco empregado, é também um ensaio importante. Um exemplo foi observado para a toxina cilindropermopsina (CYN), no qual foi evidenciado que os efeitos inibitórios dependem da presença de detritos: extratos brutos livre de detritos celulares causaram maior inibição de crescimento do que as células extratos contendo detritos. Esses resultados sugerem que matriz celular pode ter um papel significativo no efeito de CYN. Genericamente, os detritos celulares podem servir como uma parte de ligação temporária da superfície dos compostos bioativos dissolvidos, levando à diminuição dos efeitos inibitórios e ainda podem conter maior quantidade de diferentes compostos benéficos associados às partículas (por exemplo, nutrientes e compostos semelhantes a hormônios (Prince et al. 2008).

Além do estudo das interações em culturas, métodos analíticos são empregados para o isolamento e a determinação da estrutura de compostos alelopáticos, como: ressonância magnética nuclear, raios X, UV, espectroscopia de massa, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa espectrometria de massa / massa. Uma grande dificuldade para o isolamento de bioativos compostos é que eles geralmente são produzidos em quantidades muito baixas, uma vez que produzir uma quantidade baixa de um ativo altamente ativo é uma estratégia mais econômica para a célula (Leflaive and Ten-Hage 2007). A aplicação desses métodos geralmente é associada a um bioensaio para determinar qual fração contém o composto ativo (Mello et al. 2012).

Como na microscopia clássica, uma abordagem de aprendizado de máquina recente tem sido empregada para detectar e quantificar morfoespécies potenciais produtores de aleloquímicos usando citometria de fluxo de imagem baseada em FlowCAM.

1.4. Diversidade de cianobactérias e alelopatia

Os principais representantes de cianobactérias que desempenham atividade alelopáticas e suas interações, são os gêneros *Microcystis*, *Raphidiopsis*, *Anabaena/Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*. Esses, são muito frequentes nos sistemas hídricos brasileiros e causadores de florações de cianobactérias. Já *Phormidium*, apesar de pouco frequente, é um gênero que possui uma maquinaria biossintética poderosa na produção de aleloquímicos para finalidades biotecnológicas (Dias et al. 2017).

Mais a frente, apresentamos um importante representante das picocianobactérias, *Synechococcus*. Este gênero tem se mostrado emergente em alguns sistemas hídricos por crescerem muito rapidamente e causarem florações (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

1.4.1. Interação alelopática entre cianobactérias

A seguir estão relacionadas as principais interações entre as cianobactérias levantadas na literatura.

Nos experimentos de interação *Microcystis aeruginosa* com outras cianobactérias, demonstram grande vantagem competitiva com *Microcystis wesenbergii*, *Dolichospermum* e *Planktothrix*, aparentemente relacionada a condição de produtora de microcistina tornando-a mais competente nas interações. Fatores abióticos de temperatura e nutrientes influenciaram na dominância deste gênero.

Yang *et al.*, (2014), relataram um experimento entre duas espécies de *Microcystis*. *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistina inibiu o crescimento de *Microcystis wesenbergii* (não produtora de microcistina). Apesar do estresse da interação ter ativado a produção de microcistina em *Microcystis aeruginosa*, o efeito inibitório de *Microcystis aeruginosa* sobre *M. wesenbergii* possivelmente está relacionada a outros compostos produzidos por essa interação.

Microcystis wesenbergii se mostrou também suscetível a *Anabaena*, porém não é possível saber se a inibição deve-se à produção de algum aleloquímico ou competição, uma vez que *Anabaena* apresenta uma taxa de crescimento maior que *Microcystis wesenbergii*. A teoria matemática prevê que a área superficial relativa de *M. wesenbergii* é menor que o de *Anabaena*, conseqüentemente, *Anabaena* absorve os nutrientes com mais eficiência do que *Microcystis wesenbergii* (Yang et al. 2014).

Em relação à competição com a cianobactéria filamentosa *Planktothrix*, o gênero *Microcystis* causou efeito inibitório, reduzindo o crescimento de *Planktothrix*, diminuindo do tamanho de tricoma (filamento) e induzindo a produção de compostos. Não foi possível identificar especificamente os compostos que causam as alterações fisiológicas e morfológicas observadas das células de *Planktothrix*, porém constatou-se que co-cultura induz compostos específicos como resposta de *Microcystis* à presença de *Planktothrix* (Briand et al. 2019).

A interação de *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistina) e *Dolichospermum* sp, resultou em aumento da concentração microcistina de *Microcystis aeruginosa*. A interação apresentou efeito alelopático positivo em *Dolichospermum* sp. quando a concentração de microcistina-LR estava abaixo de 0,1 µg/L e negativo quando a concentração de MC-LR superou 1 µg/L.

Em outro experimento realizado, por Chia (2016), *Microcystis* também dominou sobre *Dolichospermum*, porém o fator nutricional foi determinante na dominância entre os organismos.: (1) Em **condições repletas de nutrientes**, *Microcystis* liberou metabólitos secundários que inibiram o crescimento de *Dolichospermum*, suprimiram a fixação de nitrogênio e suprimiu a produção de anatoxina-a. (2) Em **condições de deficiência de nitrogênio**, *Dolichospermum* inibiu o crescimento de *Microcystis* e a produção de microcistina, sugerindo que, nessas condições, *Microcystis* possui efeito alelopático diminuído, favorecendo *Dolichospermum* que pode fixar nitrogênio sob condições de baixo nitrogênio (N). Esse resultado não indica que *Dolichospermum* produza aleloquímicos para inibir *Microcystis*, mas que *Dolichospermum* foi menos inibida por *Microcystis* em condições de baixo N. Ao mesmo tempo que a deficiência de nitrogênio é um fator determinante no desenvolvimento de *Microcystis* e inibe a produção de microcistina (Mathias A. Chia et al. 2018).

Em resumo, os nutrientes afetarão diretamente as interações entre *Microcystis* e *Dolichospermum*. Ambientes com baixa concentração de nitrogênio permitirão a dominância de *Anabaena* sobre *Microcystis*, enquanto o inverso ocorrerá sob altos nutrientes e baixas condições de P, com essa alternância entre gêneros parcialmente controlada por interações alelopáticas entre as espécies.

Até aqui vimos que *Microcystis* dominou sobre as populações de *Microcystis wesenbergii*, *Planktothrix* e *Dolichospermum* e apresentou forte atividade alelopática inibitória. No entanto a competência *Microcystis* é inferior a *Tychonema* e *Raphidiopsis*.

A *Phormidiaceae Tychonema bourrellyi*, apesar de não existir no Brasil, apresenta forte efeito alelopático inibidor em *Microcystis aeruginosa*, por uma indução da morte celular pelo aleloquímico β-ionona. Shao et al., (2013), decidiram avaliar o efeito de *Tychonema* sobre *Microcystis* após evidências de que espécies de *Microcystis* raramente eram detectadas nas áreas dominadas por *Tychonema* na China (Shao et al. 2013).

Microcystis aeruginosa também é inibida em ensaios de co-cultura com *Raphidiopsis raciborski* que, sob competição, produz aleloquímicos que inibem o crescimento e ativam a formação de colônias em *Microcystis aeruginosa*. Nesse caso, a mucilagem representa uma resposta do mecanismo de defesa de *Microcystis*, que pode atuar como um envelope protetor, desempenhando um papel importante na seletividade de nutrientes e na defesa contra a intoxicação por metais. Existe analogia na formação de colônias em *Microcystis aeruginosa* como uma defesa contra herbivoria (Mello et al. 2012).

Em 2007, Figueredo também testou a habilidade alelopática de *Raphidiopsis raciborskii* contra *Microcystis aeruginosa* e alguns grupos de fitoplâncton. Nesse estudo, ele verificou que os metabólitos alelopáticos comprometeram a maquinaria fotossintética de alguns grupos fitoplânctônicos, sendo que *Microcystis aeruginosa* apresentou a maior e mais alta sensibilidade à *Raphidiopsis raciborskii* entre os representantes avaliados.

Um estudo realizado por Rzymiski e colaboradores (2014), para avaliar a competição entre *Raphidiopsis raciborskii* não produtora de cilindrospermopsina e *Microcystis aeruginosa* resultou em inibição do crescimento de *Microcystis aeruginosa* pelas cepas de *Raphidiopsis* não produtora de cilindrospermopsina por algum aleloquímico análogo à toxina.

Apesar de *Raphidiopsis* inibir o crescimento de *Microcystis*, não possui a mesma atividade contra *Planktothrix*, onde em cultura se inibiram mutuamente. Fatores abióticos interferiram na dominância entre os gêneros. *Planktothrix* dominou sob altas concentrações de nitrogênio, baixa intensidade de luz e altas concentrações de nutrientes e foi drasticamente inibido pela privação de nitrogênio, em contraste com *Raphidiopsis*. Apesar de não ter sido observado nenhum efeito alelopático significativo, taxas de crescimento significativamente menores foram obtidas em culturas mistas, o que pode refletir outras interações de interferência entre as espécies (Ammar et al. 2014).

Interessante notar que esses três gêneros: *Planktothrix*, *Microcystis* e *Raphidiopsis* comumente coexistem em sistemas hídricos e ambientes eutrofizados. A relação apresentada de que *Planktothrix* é inibida por *Microcystis*

que é inibida por *Raphidiopsis* que não inibe *Planktothrix*, indica um forte indício de sucessão ecológica entre esses gêneros.

Ao mesmo tempo, em florações de cianobactérias, onde coexistiam cepas tóxicas e não-tóxicas, a cepa produtora de microcistina pode obter a vantagem sobre subpopulações não-tóxicas (Omidi, Esterhuizen-Londt, and Pflugmacher 2019a).

1.4.2. Interação alelopática entre cianobactérias e microalgas verdes

A competição entre culturas da cianobactéria *Chrysochloris* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* produtora de cilindrospermopsina e a microalga verde bentônica *Chlorococcum* sp, resultou na inibição do crescimento da microalga verde, porém, ainda assim, foi observado algum efeito inibitório no crescimento da cianobactéria. A microalga verde foi capaz de produzir compostos anticianobacterianos inibitórios ao crescimento de *Aphanizomenon*, porém o efeito foi neutralizado à medida que a população de cianobactéria aumentava em proporção à da microalga (Béres, 2015). O autor aponta que a inibição não foi resultante da limitação de nutrientes, mas possivelmente devido à presença de cilindrospermopsina e / ou outros aleloquímicos (Figura 11).

Microcystis aeruginosa demonstrou efeitos alelopáticos, inibindo o crescimento de *Chlorella vulgaris* através da liberação de ácido linoleico e ainda se beneficiando do composto de sinalização celular óxido nítrico produzido por *C. vulgaris*, que estimula um mecanismo de feedback positivo da liberação de ácido linoleico por *Microcystis aeruginosa*.

Experimentos realizados entre co-culturas de *Microcystis aeruginosa* e microalgas verdes, demonstraram que a temperatura interfere no efeito alelopático (Leão, Vasconcelos, & Vasconcelos, 2009a):

a) As culturas de *Chlorella vulgaris* foram estimuladas na temperatura de 20°C e inibidas em temperatura maiores de 25°C. (Ma et al., 2015).

b) Com *Scenedesmus obliquus* o efeito inibitório de crescimento causado por *Microcystis aeruginosa* ocorreu apenas entre 20 e 30°C. Temperaturas inferiores a 20°C o efeito alelopático foi estimulante (Qiu et al. 2017). Estes ensaios sugerem que o impacto no crescimento e fotossíntese resultantes das interações alelopáticas entre cepas tóxicas e não tóxicas de *Microcystis aeruginosa* e outras espécies do fitoplâncton são dependentes da temperatura. A vantagem dos efeitos nocivos a baixas temperaturas se transformou em efeitos deletérios a temperaturas altas.

Os experimentos realizados por (Wang et al. 2017), demonstraram que os efeitos de *Microcystis aeruginosa* sobre representantes de microalgas, dependem das fases de crescimento da cianobactéria. Com relação aos efeitos alelopáticos em ensaios de co-cultura, constatou-se que *Microcystis aeruginosa* na fase de crescimento exponencial e estacionária inibiram significativamente o crescimento de *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Cyclotella meneghiniana*. A fase de declínio estimulou o crescimento em todas as espécies durante a fase de declínio de *Microcystis aeruginosa*. Os efeitos negativos de *Microcystis aeruginosa* no crescimento de duas algas verdes comuns e uma espécie de diatomáceas ocorreu durante sua fase de crescimento exponencial e estacionário.

Um estudo entre cepas tóxicas (produtoras de microcistina) e não-tóxicas (deficientes em microcistina) de *Microcystis aeruginosa* e *Desmodesmus subspicatus*, uma alga verde de água doce, foi realizado em ensaio de co-cultura demonstrou que tanto as linhagens tóxicas e não tóxicas de *Microcystis*, afetaram negativamente o crescimento da alga verde, contudo, a inibição do crescimento em co-cultivo com o *Microcystis* tóxica foi significativamente maior e ocorreu em dias anteriores, evidenciando a provável importância da microcistina para *Microcystis* tóxica. A interação entre *Desmodesmus* sp e *Microcystis* tóxica não ativou a produção de microcistina. (Omidi, Esterhuizen-Londt, and Pflugmacher 2019a). Os autores ainda informam que os efeitos inibitórios de *Microcystis* no crescimento da alga verde não estavam estritamente relacionados à microcistina, mas também ao aumento da liberação dos outros metabólitos secundários. Estudos anteriores mostraram que outros metabólitos secundários de *Microcystis*, como micropeptina, microviridina, microgenina, bem como alguns compostos não identificados, podem interferir nas interações entre espécies (Schatz et al. 2007).

1.4.3. Interação alelopática entre cianobactérias e bactérias

A interação de *Microcystis* contra *Pseudomonas* indicou que *Microcystis* coloniais são menos suscetíveis às propriedades algicidas de *Pseudomonas* que as *Microcystis* unicelulares, reforçando os indícios do caráter protetor do exopolissacarídeo (EPS) que forma a mucilagem característica de *Microcystis*, um fenômeno análogo como uma resposta morfológica a predadores (Rios et al. 2016).

Um exemplo de efeito alelopático mutualmente positivo ocorre com a interação entre *Microcystis* e bactérias heterotróficas. Nesse caso, a produção de EPS por *Microcystis* resulta na agregação celular e produção de mucilagem. A formação de colônias de *Microcystis* facilita a manutenção de alta biomassa por um longo tempo, e o crescimento de bactérias heterotróficas é aumentado pela secreção de EPS de *Microcystis aeruginosa*, permitindo formular a hipótese de que as mudanças morfológicas não são uma estratégia defensiva contra as bactérias heterotróficas, mas o resultado de ações mútuas. *Porphyrobacter*, *lavobacteriaceae* e uma bactéria não cultivada poderiam ser bactérias especializadas responsáveis pela agregação de *Microcystis aeruginosa* (Rios et al. 2016).

1.4.4. Interação alelopática entre Cianobactérias e Zooplâncton

A recuperação do envelope mucilaginoso também foi observada quando *Microcystis aeruginosa* cultivada foi exposta, direta ou indiretamente, a zooplâncton ou ao fitoflagelado *Ochromonas* sp. O aumento celular de *Microcystis* foi notado quando esses organismos foram expostos direta e indiretamente ao zooplâncton e, nesse caso, essa alteração morfológica poderia ser considerada como um mecanismo de defesa contra predação (Rios et al. 2016).

Raphidiopsis raciborskii tóxica pareceu reduzir a aptidão e o crescimento de *Daphnia magna*, em parte devido à produção de cilindrospermopsina. Já a cepa *Raphidiopsis raciborskii* não produtora de cilindrospermopsina, apresentou a mesma atividade neste microcrustáceo, porém em menor grau (Leflaive and Ten-Hage 2007).

O tamanho relativamente grande, a toxicidade e / ou a palatabilidade reduzida de *Raphidiopsis raciborskii* também podem reduzir a herbivoria. É comum observamos no Brasil, *Raphidiopsis* na forma espiralada, indicando uma estratégia para minimizar a aptidão do zooplâncton (Figueredo, Giani, and Bird 2007). Os ambientes dominados pelas espécies geralmente têm copépodes com comportamento alimentar seletivo e, portanto, baixa ingestão de alimentos nocivos (Holland and Kinnear 2013).

O fitoflagelado *Cryptomonas* pode se alimentar de *Microcystis aeruginosa* tóxica. O resultado da interação diminui a produção de microcistina-LR (Holland and Kinnear 2013)

1.4.5. Interação alelopática entre Cianobactérias / Cianotoxinas com Macrófitas

Plantas aquáticas produzem substâncias que inibem o crescimento de cianobactérias. A macrófita submersa, *Myriophyllum spicatum* induziu estresse alelopático e morte programada em *Microcystis aeruginosa* em um sistema de co-cultura (He et al. 2016).

A microcistina LR inibiu o crescimento, reduziu a produção de oxigênio fotossintético e causou alterações no padrão de pigmento. *Ceratophyllum demersum* e *Myriophyllum spicatum* foi testado por seu poder alelopático em macrófitas aquáticas (Erhard 2006)(Zhu et al. 2010).

O pirogalol, um aleloquímico produzido por macrófitas, apresenta propriedades positivas na produção de microcistina, por indução da expressão do gene de síntese de microcistina *mcyB* de *Microcystis aeruginosa*. Em contrapartida, o pirogalol pode ter efeito alelopático em *Microcystis aeruginosa* (dano oxidante). As análises de expressão de *psbA*, *recA*, *grpE* e *fabZ* indicaram que as membranas são o primeiro alvo dos danos do pirogalol a *Microcystis*. (Shao et al. 2009). A anatoxina-a induziu o estresse oxidativo causando efeitos alelopáticos negativos na macrófita submersa *Ceratophyllum demersum*. Neste experimento foi verificado que a macrófita pode interagir com a anatoxina-a, com base na reação imediata de seus sistemas de defesa enzimática à toxina (Ha and Pflugmacher 2013).

Culturas mistas entre *Microcystis aeruginosa* e a lentilha *Lemma japonica* mostraram que houve inibição recíproca do crescimento (Xian 2015). Neste experimento, os autores sugeriram que produção de microcistina

intracelular pela *Microcystis* foi uma resposta a produção de um aleloquímico pela lentilha, e que as microcistinas liberadas no meio extracelular foram causadas por lise natural ou física.

O composto, ácido pirogálico, produzido por plantas aquáticas, teve efeitos prejudiciais dependentes da dose no crescimento e na fotossíntese de *Raphidiopsis raciborskii* (Z. Wu, Shi, and Yang 2013). (Anexo A).

1.5. Picocianobactérias

Picocianobactérias são cianobactérias com tamanho de célula na faixa de 0,2–2,0 µm. Foram reconhecidas nos últimos anos como componentes importantes do fitoplâncton, não apenas em águas doces e ecossistemas salobras, mas também nos oceanos, constituindo uma importante ligação na cadeia alimentar e base da produção primária e serem responsáveis por até 80-90% da produção total de carbono em habitats aquáticos (Barreiro Felpeto et al. 2018).

A característica morfológica do pequeno tamanho permite que as picocianobactérias possam flutuar efetivamente na água, apesar da ausência de aerótopos (vacúolos de gás), permitindo que ela se beneficie da luminosidade da superfície. Além disso, também devido ao seu tamanho pequeno, eles também tem uma alta relação superfície-volume, permitindo uma taxa mais rápida de captação de nutrientes e, portanto, taxa de crescimento, em comparação com células maiores de fitoplâncton (Barreiro Felpeto et al. 2018).

Há evidências que *Synechococcus* sp. são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, portanto são fortes concorrentes na comunidade fitoplanctônica e isso lhes permite constituir a maior fração da produção primária nos ecossistemas aquáticos do mundo (Barreiro Felpeto et al. 2018).

Recentemente, uma picocianobactéria *Cyanogranis ferruginea* (Figura 14); tem sido encontrada nos sistemas hídricos brasileiros, ainda com mais frequência que *Synechococcus* e outras picoplânctônicas. Apesar de ter sido incluída neste levantamento bibliográfico não foram encontradas informações que direcionem para os fatores que regulam o seu crescimento.

1.5.1. Fator abiótico: Irradiância

A irradiância é um dos principais fatores que controlam o crescimento, a atividade fotossintética e a distribuição de picocianobactérias. As cianobactérias são geralmente reconhecidas como preferindo baixa intensidade de luz para o crescimento. *Synechococcus* sp. conseguem se adaptar a irradiância em uma faixa ampla de intensidade, desenvolvendo-se com sucesso em águas superficiais bem iluminadas e em águas mais profundas com baixa luminosidade. Essa capacidade adaptativa é conferida devido à modulação da composição dos pigmentos fotossintéticos para usar melhor a luz disponível e proteger-se dos efeitos desfavoráveis da luz excessiva, tolerando irradiância tão alta quanto 2000 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹. A irradiância também pode desempenhar um papel importante na regulação da produção aleloquímica em algumas espécies de picocianobactérias (Barreiro Felpeto et al. 2018).

1.5.2. Fator abiótico: Temperatura

As picocianobactérias atingem taxas máximas de crescimento em temperaturas mais altas que outras cianobactérias e, portanto, será potencialmente promovido pelo futuro aquecimento climático.

Em estudos realizados por (Śliwińska-Wilczewska, Pniewski, and Latała 2016) foi evidenciado que o aumento da temperatura de 15°C a 30°C aumentou a abundância de picocianobactérias e que a produção de substâncias alelopáticas por picocianobactérias é regulada pela temperatura (Barreiro Felpeto et al. 2018). Esses estudos indicaram que alta luminosidade, temperatura e baixa salinidade afetaram as picocianobactérias testadas, aumentando sua atividade alelopática (Barreiro Felpeto et al. 2018).

A picocianobactéria *Synechococcus* sp. é capaz de produzir e liberar compostos não identificados que tem efeito alelopático negativo de inibição em todas as assembléias fitoplanctônicas. As diatomáceas dos gêneros *Navicula*, *Chaetoceros*, *Amphora*, *Coscinodiscus*, *Grammatophora* e *Nitzschia* são os organismos mais afetados, porém podem principalmente influenciar cianobactérias filamentosas coexistentes tanto negativamente quanto positivamente (Barreiro Felpeto et al. 2018).

Investigações recentes sugerem que *Synechococcus* sp. pode sintetizar 2-metilisoborneol (MIB) e geosmina (1,2,7,7-tetrametil-2-norborneol; GSM). Também foi demonstrado que o MIB é produzido e secretado durante o ciclo celular de cianobactérias (fase exponencial) enquanto o GSM é liberado somente após a morte das células. Os efeitos tóxicos desses compostos para outros organismos ainda não foram demonstrados, mas influenciam a qualidade da água e dos organismos (Barreiro Felpeto et al. 2018).

Synechococcus sp. e *Synechocystis* sp. apresentam atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Foi observada atividade antibiótica contra duas bactérias Gram-positivas, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum* e *Cellulomonas*, enquanto não foram encontrados efeitos inibitórios contra o fungo *Candida albicans* e bactérias Gram-negativas (Vassilakaki and Pflugmacher 2008).

Synechococcus leopoliensis é capaz de produzir antimicrobiano contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A produção de agentes antimicrobianos é mais ativa na temperatura de 35°C, pH 8 e 15 dias de incubação. Porém altos níveis de atividade antimicrobiana de *Synechococcus leopoliensis* poderiam ser atribuídos à natureza química dos suplementos (Śliwińska-Wilczewska, Pniewski, and Latała 2016).

Apesar da importância ecológica das cianobactérias picoplanctônicas, pouco se sabe sobre seus efeitos alelopáticos em outros organismos. Sabe-se que as picocianobactérias produzem uma variedade de compostos bioativos, cuja nocividade a animais e humanos foi claramente demonstrada. Ao mesmo tempo, o papel funcional desses compostos, particularmente em termos de fisiologia e ecologia das cianobactérias que os produzem, permanece amplamente desconhecido. A produção e liberação de compostos alelopáticos com propriedades diferentes podem dar às espécies produtoras uma vantagem competitiva e construir sua estratégia eficaz. Além disso, compostos alelopáticos secretados por picocianobactérias podem ser responsáveis pela seleção natural de organismos e sucessão ecológica. Os resultados de estudos que as picocianobactérias podem servir como uma fonte potencial de compostos bioativos interessantes, cujo modo de ação em organismos-alvo requer investigação detalhada (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

A vantagem competitiva sobre outros organismos devido ao seu amplo potencial de adaptação às mudanças nas condições ambientais e sua atividade alelopática, confirmam o caráter perigoso de florações de picocianobactérias em ambiente aquático. Esse tipo de floração tende a se espalhar e permanecer por muito tempo, causando mudanças drásticas e adversas nos ecossistemas aquáticos (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

Foi sugerido que a atividade alelopática exibida pela picocianobactéria *Synechococcus* sp. é provavelmente uma das principais estratégias competitivas que afetam algumas das espécies de fitoplâncton coexistentes nos ecossistemas aquáticos (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

A crescente ocorrência de picocianobactérias em grandes densidades em habitats aquáticos resultantes de eutrofização e aquecimento global representa uma séria ameaça aos seres humanos e aos ecossistemas. Claramente, é necessário aumentar nosso conhecimento sobre a produção de aleloquímicos por cepas de picocianobactérias, a fim de evitar possíveis efeitos adversos de sua ocorrência (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

1.5.3. *Synechococcus* x Cianobactérias filamentosas

A picocianobactéria *Synechococcus* sp. (Figura 16). produz diferentes aleloquímicos nas interações com cianobactérias filamentosas, contra *Nostoc* sp. e *Phormidium* sp, inibiu significativamente o crescimento estimulou o crescimento de *Anabaena flos-aquae* e em *Rivularia*, não houve interferência no crescimento, mas houve danos às membranas celulares inibindo a fotossíntese. Em *Anabaena* e *Nostoc* houve o aumento da concentração de carotenóides, indicando ativação de sistema de resposta fisiológica de proteção ao dano alelopático, porém o ensaio demonstrou que *Synechococcus* pode produzir diversos aleloquímicos, capazes de inibir vários mecanismos de atividade (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

Synechococcus sp. produziu aleloquímicos que causaram efeito inibitório sobre *Nodularia spumigena*, desencadeando respostas fisiológicas, levando à redução do teor de clorofila a (Cl-a) e carotenóide (Car), distorções na forma celular e, freqüentemente, lise celular. e, surpreendentemente, não houve efeito recíproco das cianobactérias filamentosas. O mesmo efeito foi observado tanto em co-culturas quanto em filtrados sem células (Barreiro Felpeto et al. 2018).

Segundo, (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017), *Synechococcus* sp. é capaz de fixar nitrogênio atmosférico, produzir as cianotoxinas microcistinas (MC-LR e MC-YR) o aminoácido neurotóxico não proteico, β -N-metilamino-l-alanina (BMAA).

Toleram níveis elevados de luz e se adaptam a diferentes irradiâncias. Podem alterar a composição dos pigmentos fotossintéticos para usar melhor quantidade de luz disponível e proteger-se dos efeitos desfavoráveis da luz excessiva e de pouca luz. Essa habilidade confere vantagem às picocianobactérias em águas com pouca luminosidade (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

A variação na intensidade da luz, temperatura e salinidade da água deve ser considerada na estimativa dos efeitos potenciais da alelopatia por picocianobactérias em ambientes aquáticos, e atingem taxas máximas de crescimento em temperaturas mais altas do que outras cianobactérias (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

S. leopoliensis produziu um aleloquímico antimicrobiano sob a temperatura de 35°C, pH 8 contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Porém os autores sugeriram que a natureza química dos suplementos do meio de cultura do ensaio, foram os responsáveis pela produção do agente antimicrobiano de *S. Leopoliensis* (Śliwińska-Wilczewska et al. 2017).

S. elongatus é inibida pela presença da microcistina-RR (MC-RR), possivelmente devido à inibição da fotossíntese pela toxina (Holland and Kinnear 2013).

2. Aplicação do sistema de análise de imagens automatizado Flowcam no estudo da alelopatia

Estudos preliminares utilizando o sistema de análise de imagens por citometria de fluxo para a realização do ensaio de cianobactérias, demonstrou que é possível obter informação em tempo real da dinâmica da comunidade aquática, detectando características importantes no estudo da alelopatia, como: tamanho de colônias, concentração de pigmentos, representatividade de gêneros presentes, quantificação em número de organismos e área.

A operação do equipamento requer o processamento da diluição das amostras de água, limitando a detecção de microrganismos presentes em menor concentração. Entretanto, demonstrou eficiência ao detectar cianobactérias predominantes potenciais produtores de metabólitos secundários.

O equipamento não detectou cianobactérias picoplânctônicas, como *Synechococcus* e *Cyanogranis*; De acordo com a especificação técnica do equipamento essa limitação já era conhecida.

As grandes vantagens são a velocidade de análise em relação ao método clássico por microscopia e a possibilidade de registro permanente das imagens.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por todos os resultados apresentados, é impressionante observar a complexidade de interações lideradas pela cianobactérias e quantidade de questionamentos que ainda precisam de respostas.

Dentre as cianobactérias mais preocupantes, a *Raphidiopsis* se apresenta com grande ameaça pelo seu potencial competitivo e de produção de aleloquímicos de forma constitutiva, independente de interação.

A *Microcystis* é o gênero que apresenta o maior sistema defensivo entre as cianobactérias, possivelmente por inúmeros processos adaptativos e evolutivos, que se perpetuaram no fenótipo de gênero.

Um resultado observado em todos os trabalhos, é que aleloquímicos, principalmente as cianotoxinas, são moléculas indicadoras de estresse abiótico ou por competição. Não é viável para a cianobactéria produzir uma molécula que exige um alto grau de energia, sem a real necessidade de defesa. Isso é comprovado em condições ideais de desenvolvimento, as cianobactérias não produzem aleloquímicos.

As cianobactérias produtoras de cianotoxinas são mais adaptadas e competitivas em relação as não tóxicas, e mostram-se mais aptas a se perpetuarem nos ambientes aquáticos de uma maneira geral., Mesmo as

cianobactérias não tóxicas, podem produzir compostos de defesa e estratégia de adaptação para determinados concorrentes.

Dentre as picocianobactérias, a mais estudada foi *Synechococcus*, aparentemente pelo seu poder adaptativo e competitivo. Recomenda-se atenção especial a este gênero. Como verificado ela inibe uma grande variedade de micro-organismos e principalmente os gêneros de cianobactérias mais competitivos.

Infelizmente faltam estudos sobre concentrações ambientalmente relevantes, que poderiam fornecer resultados mais precisos, e indicar o que deve ser dado atenção.

A aplicação de meios com metabólitos purificados é necessária para especificar efeitos exatos, embora o uso deles possam levar a respostas mais fracas do que o uso de extratos brutos. Faltam resultados sobre o papel dos aleloquímicos e estudos sobre sinergismo entre as cianotoxinas.

O maior desafio é extrapolar os resultados obtidos em laboratório para o meio aquático, porém as informações apresentadas neste trabalho podem fornecer algumas respostas para os gestores de monitoramento de sistemas hídricos.

De modo geral, o Sistema de Análise de Imagens Automatizado, forneceu informações que poderão dar indícios do comportamento do corpos hídricos e as interações alelopáticas presentes, comparando-se a literatura científica sobre alelopatia. No entanto, será necessário analisar variados pontos de monitoramento e ensaios comparativos para determinar com precisão as limitações e potenciais ganhos na aplicação dessa metodologia no estudo da alelopatia ou ainda nas atividades obrigatórias na determinação de cianobactérias para cumprimento de legislações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammar, M., Comte, K., Chi Tran, T. Du, & Bour, M. El. (2014). Initial growth phases of two bloom-forming cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*) in monocultures and mixed cultures depending on light and nutrient conditions. *Annales de Limnologie*, 50(3), 231–240. <https://doi.org/10.1051/limn/2014096>
- Barreiro Felpeto, A., Sliwinska-Wilczewska, S., Złoch, I., & Vasconcelos, V. (2018). Light-dependent cytolysis in the allelopathic interaction between picoplanktic and filamentous cyanobacteria. *Journal of Plankton Research*, 40(2), 165–177. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby004>
- B-Béres, V., Vasas, G., Dobronoki, D., Gonda, S., Nagy, S. A., & Bácsi, I. (2015). Effects of cylindrospermopsin producing cyanobacterium and its crude extracts on a benthic green alga - Competition or allelopathy? *Marine Drugs*, 13(11), 6703–6722. <https://doi.org/10.3390/md13116703>
- Berry, J. P., Gantar, M., Perez, M. H., Berry, G., & Noriega, F. G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6(2), 117–146. <https://doi.org/10.3390/md6020117>
- Bittencourt-Oliveira, M. do C., Chia, M. A., Camargo-Santos, D., & Dias, C. T. S. (2016). 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. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0534-4>
- Briand, E., Reubrecht, S., Mondeguer, F., Sibat, M., Hess, P., Amzil, Z., & Bormans, M. (2019). Chemically mediated interactions between *Microcystis* and *Planktothrix*: impact on their growth, morphology and metabolic profiles. *Environmental Microbiology*, 21(5), 1552–1566. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14490>
- Chia, M. A., Jankowiak, J. G., Kramer, B. J., Goleski, J. A., Huang, I. S., Zimba, P. V., do Carmo Bittencourt-Oliveira, M., & Gobler, C. J. (2018). Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena* (*Dolichospermum*) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful Algae*, 74, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.03.002>

- Dias, F., Antunes, J. T., Ribeiro, T., Azevedo, J., Vasconcelos, V., & Leão, P. N. (2017). Cyanobacterial Allelochemicals But Not Cyanobacterial Cells Markedly Reduce Microbial Community Diversity. 8(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01495>
- Erhard, D. (2006). Allelopathy in aquatic environments. Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications, 433–450. https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_19
- Figueredo, C. C., Giani, A., & Bird, D. F. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology*, 43(2), 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00333.x>
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., & Song, L. (2012). The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology*, 14(3), 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x>
- Gantar, M., Berry, J. P., Thomas, S., Wang, M., Perez, R., & Rein, K. S. (2008). Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00439.x>
- Granéli, E., Hansen, P. J., Algal, H., & Known, S. (2006). 15 Allelopathy in Harmful Algae : A Mechanism to Compete for Resources ? 15 . 2 Approaches to Demonstrate / Study Allelopathy – Pitfalls and Strength / Weaknesses of Experimental Approaches. 189, 189–201.
- Ha, M., & Pflugmacher, S. (2013). Time-dependent alterations in growth , photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Aquatic Toxicology*, 138–139, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.007>
- He, Y., Zhou, Q. H., Liu, B. Y., Cheng, L., Tian, Y., Zhang, Y. Y., & Wu, Z. Bin. (2016). Programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by allelopathic effect of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* in co-culture system. *Journal of Applied Phycology*, 28(5), 2805–2814. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0814-7>
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*, 11(7), 2239–2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
- Leão, P. N., Engene, N., Antunes, A., Gerwick, W. H., & Vasconcelos, V. (2012). The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports*, 29(3), 372–391. <https://doi.org/10.1039/c2np00075j>
- Leão, P. N., Pereira, A. R., Liu, W. T., Ng, J., Pevzner, P. A., Dorrestein, P. C., König, G. M., Vasconcelos, V. M., & Gerwick, W. H. (2010). Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11183–11188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914343107>
- Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D., & Vasconcelos, V. M. (2009a). Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. *European Journal of Phycology*, 44(3), 347–355. <https://doi.org/10.1080/09670260802652156>
- Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D., & Vasconcelos, V. M. (2009b). Allelopathy in freshwater cyanobacteria Allelopathy in freshwater cyanobacteria Pedro N. Leo et al. *Critical Reviews in Microbiology*, 4, 271–282. <https://doi.org/10.3109/10408410902823705>
- Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D., Vasconcelos, V. M., Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D., Vasconcelos, V. M., & Lea, P. N. (2009). Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. 0262. <https://doi.org/10.1080/09670260802652156>

- Leflaive, J., & Ten-Hage, L. (2007). Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: A comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, 52(2), 199–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x>
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Granéli, E. (2003). Allelopathy in phytoplankton - Biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406–419. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-406.1>
- Ma, H., Wu, Y., Gan, N., Zheng, L., Li, T., & Song, L. (2015). Growth inhibitory effect of *Microcystis* on *Aphanizomenon flos-aquae* isolated from cyanobacteria bloom in Lake Dianchi, China. *Harmful Algae*, 42(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.12.009>
- Mello, M. M. E., Soares, M. C. S., Roland, F., & Lüring, M. (2012a). Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Plankton Research*, 34(11), 987–994. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs056>
- Mello, M. M. E., Soares, M. C. S., Roland, F., & Lüring, M. (2012b). Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Plankton Research*, 34(11), 987–994. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs056>
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M., & Pflugmacher, S. (2019). *Desmodesmus subspicatus* co-cultured with microcystin producing (PCC 7806) and the non-producing (PCC 7005) strains of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology*, 834–842. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02082-6>
- Poulton, N. J. (2016). Flowcam: Quantification and classification of phytoplankton by imaging flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1389, 237–247. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3302-0_17
- Prince, E. K., Myers, T. L., Naar, J., & Kubanek, J. (2008). Competing phytoplankton undermines allelopathy of a bloom-forming dinoflagellate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1652), 2733–2741. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0760>
- Qiu, Y., Liu, F., Wang, Z., Liu, J., & Liu, L. (2017). Allelopathic Effect of *Scenedesmus* on *Microcystis Flos-aquae*. 102, 103–108. <https://doi.org/10.7763/IPCBEe>
- Rios, J. F., Leal, C. R., Leite, S. C., Janaina, R., & Retz, C. L. (2016). Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1215-5>
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., & Kaplan, A. (2007). Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology*, 9(4), 965–970. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01218.x>
- Shao, J., Peng, L., Luo, S., Yu, G., Gu, J. dong, Lin, S., & Li, R. (2013). First report on the allelopathic effect of *Tychonema bourrellyi* (Cyanobacteria) against *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1567–1573. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9969-z>
- Shao, J., Wu, Z., Yu, G., Peng, X., & Li, R. (2009). Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): From views of gene expression and antioxidant system. *Chemosphere*, 75(7), 924–928. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.021>
- Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K., & Rai, A. K. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): Facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1059–1081. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9626-3>
- Śliwińska-Wilczewska, S., Maculewicz, J., Barreiro Felpeito, A., Vasconcelos, V., & Latała, A. (2017). Allelopathic activity of picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on filamentous cyanobacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 496(April), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.07.008>

- Śliwińska-Wilczewska, S., Maculewicz, J., Felpeto, A. B., & Latała, A. (2018). Allelopathic and bloom-forming picocyanobacteria in a changing world. *Toxins*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins10010048>
- Śliwińska-Wilczewska, S., Pniewski, F., & Latała, A. (2016). Allelopathic interactions between *Synechococcus* sp. and *Nodularia spumigena* under different light conditions. *Allelopathy Journal*, 37(2), 241–252.
- Vassilakaki, M., & Pflugmacher, S. (2008). Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC 6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9222-3>
- Wang, L., Zi, J., Xu, R., Hilt, S., Hou, X., & Chang, X. (2017). Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom : Evidence from exudates addition and co-culturing. *Harmful Algae*, 61, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.010>
- Weirich, C. A., Robertson, D. M., & Miller, T. R. (2019). Physical, biogeochemical, and meteorological factors responsible for interannual changes in cyanobacterial community composition and biovolume over two decades in a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 828(1), 165–182. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3810-x>
- Wu, Y., Liu, J., Yang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhao, H., & Zhang, N. (2011). Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. *Environmental Microbiology*, 13(3), 604–615. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02363.x>
- Wu, Z., Shi, J., & Yang, S. (2013). The effect of pyrogalllic acid on growth, oxidative stress, and gene expression in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Ecotoxicology*, 22(2), 271–278. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1023-z>
- Xian, Q. (2015). Allelopathic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Microcystis wesenbergii*: Microcystin-LR as a potential allelochemical. October. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1787-z>
- Yang, J., Deng, X., Xian, Q., Qian, X., & Li, A. (2014). Allelopathic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Microcystis wesenbergii*: Microcystin-LR as a potential allelochemical. *Hydrobiologia*, 727(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1787-z>
- Yunes, J. S. (2019). Cyanobacterial Toxins. In *Cyanobacteria*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00022-2>
- Zhu, J., Liu, B., Wang, J., Gao, Y., & Wu, Z. (2010). Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. *Aquatic Toxicology*, 98(2), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.011>