

HELTON SORIANO BEZERRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS ALELOPÁTICOS DE MICROCISTINAS SOBRE O CRESCIMENTO DE
DUAS LINHAGENS DE MICROALGAS VERDES (CHLOROCOCCALES,
CHLOROPHYTA) EM CONDIÇÕES CONTROLADAS**

RECIFE-PE

2012

HELTON SORIANO BEZERRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS ALELOPÁTICOS DE MICROCISTINAS SOBRE O
CRESCIMENTO DE DUAS LINHAGENS DE MICROALGAS VERDES
(CHLOROCOCCALES, CHLOROPHYTA) EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

ORIENTADORA

Prof^ª. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

CO-ORIENTADORES

Prof^ª. Ariadne do Nascimento Moura

Prof. Renato José Reis Molica

RECIFE-PE

2012

Ficha catalográfica

O48e Oliveira, Helton Soriano Bezerra de
Efeitos alelopáticos de microcistinas sobre o crescimento de duas linhagens de microalgas verdes (Chloococcales, Chlorophyta) em condições controladas / Helton Soriano Bezerra de Oliveira. – Recife, 2012.
53 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
Inclui referências e anexo.

1. Alelopatia 2. Cianobactéria 3. Cultivos mistos
4. Microcystis 5. Produção de microcistinas I. Bittencourt-Oliveira, orientadora II. Título

CDD 581

**EFEITOS ALELOPÁTICOS DE MICROCISTINAS SOBRE O CRESCIMENTO DE DUAS LINHAGENS
DE MICROALGAS VERDES (CHLOROCOCCALES, CHLOROPHYTA) EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

HELTON SORIANO BEZERRA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA (PPGB), DA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BOTÂNICA. DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA PELA
BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADORA:

PROF^a. DR^a. MARIA DO CARMO BITTENCOURT-OLIVEIRA

TITULAR / ESALQ/USP

EXAMINADORES:

PROF. DR. ULYSSES PAULINO DE ALBUQUERQUE

TITULAR / UFRPE

PROF. DR. ÊNIO WOCYLI DANTAS

TITULAR / UEPB

PROF^a. DR. MARISTELA CASÉ COSTA CUNHA

TITULAR / ITEP

DR. GIULLIARI ALAN DA SILVA TAVARES DE LIRA

SUPLENTE / OPAS

DATA DE APROVAÇÃO: / /2011

RECIFE, 2012.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, MARIA DE FÁTIMA E HILTON SORIANO, E AS MINHAS QUERIDAS IRMÃS, MARIA SORIANO E EULÁLIA DALBA, PELOS ENSINAMENTOS, INCENTIVOS E APOIO INDISPENSÁVEL NESSA JORNADA ACADÊMICA.

EM ESPECIAL A MINHA QUERIDA MULHER DANIELLE FRANKLIN E MINHA DOCE FILHA MARINA, POR TODO AMOR E POR SEREM A FORÇA DO MEU CAMINHAR.

COM TODO CARINHO HELTON SORIANO.

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO A TODOS QUE CONTRIBUÍRAM DIRETA OU INDIRETAMENTE PARA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA (PPGB) DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE).

À COORDENADORA CARMEN SÍLVIA ZÍCKEL (UFRPE), E AOS SECRETÁRIOS DO PPGB, KÊNIA MUNIZ E SR. MANASSÉS (SEU MANO), PELA DEDICAÇÃO, INFORMAÇÕES E AJUDAS PRESTADAS, BEM COMO PELA AMIZADE.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), PELO APOIO FINANCEIRO ATRAVÉS DA CONCESSÃO DE BOLSA DE MESTRADO.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO ESTADO DE PERNAMBUCO (FACEPE), PELO AUXÍLIO MOBILIDADE DISCENTE.

AO LABORATÓRIO DE CIANOBACTÉRIAS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ (ESALQ) DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP).

AO LABORATÓRIO DE TAXONOMIA E ECOLOGIA DE MICROALGAS CONTINENTAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO.

À PROFESSORA MARIA DO CARMO BITTENCOURT-OLIVEIRA (ESALQ/USP) PELA ORIENTAÇÃO, COMPREENSÃO, PELA ÓTIMA ESTADIA EM SEU LABORATÓRIO E POR TODOS OS ENSINAMENTOS.

À PROFESSORA ARIADNE MOURA (UFRPE), PELOS ENSINAMENTOS, CARINHO, AMIZADE, RESPEITO E PELA AJUDA INDISPENSÁVEL NESSA CAMINHADA.

AO PROFESSOR RENATO MOLICA (UFRPE-UAG), PELA CO-ORIENTAÇÃO, CORREÇÕES E COMENTÁRIOS QUE MUITO CONTRIBUÍRAM PARA O MEU APRENDIZADO.

AO PROFESSOR CARLOS TADEU (ESALQ/USP), PELA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.

A TODOS OS AMIGOS, PELO APOIO E MOMENTOS DE DISTRAÇÃO: MICHELINE KÉZIA, NÍSIA ARAGÃO, EMANUEL CARDOSO, JULIANA SEVERIANO, EDUARDO FUENTES, PATRÍCIA CAMPOS, GILBERTO QUEIROZ, ÊNIO DANTAS, ISE DE GORETH, GIULLIARI LIRA, VIVIANE ALMEIDA, VIVIANE PICCIN, CÁSSIA FIGUEIREDO, DANILO CAMARGO, EDSON JÚNIOR, PATRÍCIA LIMA, LILIANE LIMA, TASSIA PINHEIRO, ÉRICA, LEIDE E A TODOS INTEGRANTES DA TUM (TURMA UNIDA DO MESTRADO).

A TODOS MEUS FAMILIARES E AMIGOS, PELO APOIO E CARINHO.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. ALELOPATIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS.....	6
2.2. A ALELOPATIA E AS FLORAÇÕES DE FITOPLANCTÔNICAS.....	6
2.3. SUBSTÂNCIAS ALELOPÁTICAS E CIANOTOXINAS.....	7
2.4. EVIDÊNCIAS ALELOPÁTICAS DAS MICROCISTINAS.....	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10

MANUSCRITO – BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE MICROCISTINAS NÃO CAUSAM EFEITOS**ALELOPÁTICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE MICROALGAS VERDES**

1. RESUMO.....	17
2. INTRODUÇÃO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. <i>Linhagens e condições de cultivos.....</i>	19
3.2. <i>Obtenção de Biomassa de Cianobactérias.....</i>	20
3.3. <i>Análises de Microcistinas.....</i>	20
3.4. <i>Obtenção dos Extratos Brutos das Linhagens de Cianobactérias.....</i>	21
3.5. <i>Experimento de Interações alelopáticas.....</i>	21
3.5.a. <i>Microalgas verdes X Cianobactéria</i>	21
3.5.b. <i>Microalgas verdes X Extratos Brutos de Cianobactérias.....</i>	22
3.6. <i>Densidade celular e taxa de crescimento.....</i>	22
3.7. <i>Análise Estatística.....</i>	22
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSSÃO.....	24
6. AGRADECIMENTOS.....	27
7. REFERÊNCIAS.....	27
8. ANEXO.....	37

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO

Figura 1. Curvas de crescimento na escala logarítmica (cel.mL^{-1}) ao longo do tempo (dias) nos controles e cultivos mistos entre as cianobactérias e microalgas verdes. **A** – *Monoraphidium convolutum* e *Microcystis aeruginosa* (MC+), **B** – *M. convolutum* e *Microcystis panniformis* (MC-), **C** – *Scenedesmus acuminatus* e *M. aeruginosa* (MC+) e **D** – *S. acuminatus* e *M. panniformis* (MC-). Controle microalga verde (○), microalga verde no cultivo misto (●), controle cianobactéria (Δ) e cianobactéria no cultivo misto (▲). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC- linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores apresentados correspondem às médias das três réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão (n=3)..... 31

Figura 2. Taxa de crescimento (μ) das cianobactérias e microalgas verdes nos controles (■) e nos cultivos mistos (□) ao longo do tempo. **A** – *Monoraphidium convolutum* e *Microcystis aeruginosa* (MC+), **B** – *M. convolutum* e *Microcystis panniformis* (MC-), **C** – *Scenedesmus acuminatus* e *M. aeruginosa* (MC+) e **D** – *S. acuminatus* e *M. panniformis* (MC-). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC- linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores apresentados correspondem às médias das três réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão (n=3)..... 32

Figura 3. Variação da produção de microcistinas por quota celular (fg.cel^{-1}) por *Microcystis aeruginosa* (MC+) ao longo do tempo no controle (■) e no cultivo misto (□) com *Monoraphidium convolutum* (A) e *Scenedesmus acuminatus* (B). Os valores correspondem às médias das três réplicas e as barras de erros representam o desvio padrão (n = 3)..... 33

Figura 4. Curvas de crescimento na escala logarítmica (cel.mL^{-1}) ao longo do tempo (dias) de *Monoraphidium convolutum* (A) e *Scenedesmus acuminatus* (B) ao longo do tempo (dias) no controle (●) e nos cultivos com extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* (MC+) correspondentes as concentrações microcistinas de $5\mu\text{g.L}^{-1}$ (○) e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ (●) e com adição de extrato de *Microcystis panniformis* (MC-) nas massas correspondentes às utilizadas nos tratamentos $5\mu\text{g.L}^{-1}$ (Δ) e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ (▲) da linhagem produtora de microcistinas. A adição dos extratos foi realizada no terceiro dia de experimento, seta indicando (→). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC-

linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores correspondem às médias das três réplicas e as barras de erros representam o desvio padrão ($n = 3$).....34

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Estudos que investigaram as concentrações de microcistinas em ambientes naturais e as respectivas concentrações encontradas (SIVONEN e JONES, 1999).....	5
---	---

MANUSCRITO

Tabela 1. Linhagens utilizadas neste estudo. BCCUSP Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo. CMEA/UFF Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar da Universidade Federal de Fluminense. UFSCar Universidade Federal de São Carlos. MC Microcistinas.....	35
--	----

Tabela 2. Linhagens das microalgas verdes, códigos dos tratamentos, extratos das linhagens e concentrações de microcistinas a serem utilizados nos experimentos. Mo <i>Monoraphidium convolutum</i> (CMEA/UFF0201). Sc <i>Scenedesmus acuminatus</i> (UFSCar036). MC Microcistinas. Mo0 e Sc0 Controle sem a adição de extratos.....	36
---	----

Oliveira, Helton Soriano Bezerra de; M.Sc.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; fevereiro de 2012; Efeitos alelopáticos de microcistinas sobre o crescimento de duas linhagens de microalgas verdes (Chlorococcales, Chlorophyta) em condições controladas; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura (Co-orientadora), Renato José Reis Molica (Co-orientador).

RESUMO

Alguns estudos em laboratório mostram que as microcistinas exercem efeitos alelopáticos sobre organismos da biota aquática. No entanto, os desenhos experimentais testam concentrações dificilmente encontradas nos ambientes naturais (acima $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), o que torna imprecisa a afirmação das microcistinas atuarem como compostos alelopáticos. Nosso estudo teve por objetivo avaliar os efeitos das microcistinas, em concentrações usualmente encontradas em condições naturais, sobre o crescimento de linhagens de microalgas verdes (*Monoraphidium convolutum* e *Scenedesmus acuminatus*). Para tanto foram realizados cultivos mistos, entre cianobactérias e microalgas verdes e cultivos dessas microalgas verdes com adição de extratos brutos de cianobactérias produtoras e não-produtoras de microcistinas. Foram utilizadas duas linhagens clonais não-axênicas de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistinas – MC+) e *Microcystis panniformis* (não-produtora – MC-). Os experimentos foram desenvolvidos sob condições controladas em laboratório (erlenmeyers com capacidade 1000 mL, com 600 mL de volume final de cultura, em meio BG11, pH 7,4 temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 14h:10h fotoperíodo (claro:escura), $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa). Foi observado que em cultivos mistos, tanto as microalgas verdes quanto as cianobactérias apresentam redução de crescimento atribuída a alterações na taxa de crescimento específico. *M. aeruginosa* (MC+) teve a produção de microcistinas elevada no cultivo com *M. convolutum*, no entanto, com *S. acuminatus* a produção não foi alterada. O crescimento das microalgas verdes não foi alterado nos tratamentos com adição de extrato brutos de células de *M. aeruginosa* (MC+) contendo $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas totais. Igualmente, para os tratamentos com extratos de *M. panniformis* (MC-) o crescimento dessas microalgas verdes não foi alterado. Os nossos resultados não suportam a função alelopática das microcistinas, pelo menos sobre o crescimento dessas microalgas verdes.

Palavras-chave: alelopatia; cianobactéria; cultivos mistos; *Microcystis*; produção de microcistinas

Oliveira, Helton Soriano Bezerra de; M.Sc.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; fevereiro de 2012; Allelopathic effects of microcystins on the growth of two strains of green microalgae (Chlorococcales, Chlorophyta) in controlled conditions. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura (Co-orientadora), Renato José Reis Molica (Co-orientador).

ABSTRACT

Some laboratory studies had shown that microcystins exert allelopathic effects on organisms of the aquatic biota. However, the experimental designs rarely test concentrations found in natural environments (above $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), which makes uncertain the action of microcystins as allelopathic compounds. Our study aimed to evaluate the effects of microcystins in concentrations usually found in natural conditions on the growth of strains of green microalgae (*Monoraphidium convolutum* and *Scenedesmus acuminatus*). For this purpose mixed cultures containing cyanobacteria and green algae were analyzed. Cultures of microalgae with the addition of crude extracts of cyanobacteria microcystin-producing and non-microcystin-producing were also performed. Two non-clonal axenic strains of cyanobacteria were used: *Microcystis aeruginosa* (microcystin-producing – MC+) and *Microcystis panniformis* (non-producer-producing – MC-). The experiments were conducted under controlled laboratory conditions (Erlenmeyers with a capacity of 1000 mL, with 600 mL of final volume of culture in BG11 medium at pH 7.4, temperature $24 \pm 1 \text{ }^\circ \text{C}$, photoperiod 14h: 10h (light:dark), $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light intensity). It was observed that in mixed cultures, both green microalgae and cyanobacteria had their growth reduced, which was observed when analyzing variations in specific growth rate. The microcystin production by *M. aeruginosa* (MC +) increased when it was in cultured together with *M. convolutum*. However when cultured with *S. acuminatus* the production did not change. The growth of green microalgae has not changed in treatments with addition of crude cell extracts of *M. aeruginosa* (MC +) containing $5\mu\text{g.L}^{-1}$ and $10\mu\text{g.L}^{-1}$ of total microcystins. Similarly, for the treatments with addition of crude cell extracts of *M. panniformis* (MC-) the growth of these green microalgae did not change. Our results do not support of the allelopathic function of microcystins, at least in the growth of these green microalgae.

Key words: allelopathy, cyanobacteria, mixed cultures, *Microcystis*, production of microcystin.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos procariontes (fotossintetizantes) e de morfologia simples (unicelulares, coloniais ou filamentosas), encontradas em diversos habitats, tais como água doce, marinha, salobras, ambiente terrestre (CARMICHAEL, 1994). Nos ambientes aquáticos, esses organismos, juntamente com os microeucariontes fotossintetizantes, compõem o fitoplâncton, comunidade responsável pela produção primária (LEFLAIVE e TEN-HAGE, 2007). Em especial, as cianobactérias de água doce são amplamente estudadas dentre os aspectos morfológicos, ecológicos, bioquímicos e fisiológicos, devido a sua importância para lagos e reservatórios (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003).

Nos ecossistemas aquáticos de água doce, as cianobactérias vêm desenvolvendo um grande problema ecológico, devido ao crescimento elevado de algumas populações. Esse fenômeno que ocasiona mudanças na coloração e no odor da água denomina-se florações ou *blooms* (CHORUS e BARTRAM, 1999). As florações de cianobactérias se apresentam como uma consequência indesejada de diversos fatores ambientais nos ecossistemas aquáticos (condições eutróficas, pH alcalino, baixa luminosidade, elevadas temperaturas) (SHAPIRO 1990; SMITH, 1996). Durante esses eventos a abundância relativa das cianobactérias é elevada, enquanto as microalgas verdes, diatomáceas e fitoflagelados diminuem em importância no plâncton.

Outra característica das cianobactérias é a capacidade de sintetizar diversos metabólitos secundários. Esses organismos são considerados rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, isto é, de compostos não utilizados em seu metabolismo primário, muitos dos quais com possível potencial farmacológico (CARMICHAEL, 1992). Entre esses, os mais conhecidos são as cianotoxinas, classificadas de acordo com a sua estrutura química (alcalóides, peptídeos cíclicos e lipopolissacarídeos) e em função da ação farmacológica (neurotóxicas, hepatotóxicas e dermatotóxicas) em mamíferos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Esses compostos podem ser acumulados na cadeia trófica, ocasionando diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes difíceis de serem diagnosticados (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003). Mortandades de peixes, animais silvestres e domésticos já foram registradas em diversas partes do mundo (CARMICHAEL, 1992), além da contaminação em humanos (JOCHIMSEN et al., 1998; CODD et al., 1999; YUAN et al., 2006).

Nas últimas décadas tem se observado um crescente aumento em escala global de florações de cianobactérias formadas por espécies tóxicas, com sérias implicações sociais e

econômicas, devido à degradação dos recursos hídricos. Os graves impactos sócio-econômicos têm atraído atenção para compreensão dos fatores e mecanismos ambientais que promovem essas florações de cianobactérias tóxicas. Tem sido sugerido que as cianotoxinas conferem alguma vantagem competitiva às espécies produtoras (JONSSON et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre a função natural desses compostos.

Um dos possíveis mecanismos que poderia explicar as florações de cianobactérias tóxicas relaciona à atuação dessas toxinas na defesa contra os predadores. Este mecanismo é suportado por trabalhos que apontam que espécies produtoras de toxinas não são escolhidas pelos predadores, além disso, a presença do predador pode induzir a produção de toxina (PIRES et al., 2002). Outro mecanismo que poderia explicar é que a liberação dessas toxinas pode inibir o crescimento ou a sobrevivência de espécies competidoras (microalgas e plantas aquáticas), através de processos alelopáticos (JANG et al., 2003).

A alelopatia é um fenômeno evidenciado em ambientes aquáticos e terrestres, e se caracteriza pela competição por interferência mediada quimicamente (LEFLAIVE e TENHAGE, 2007). No contexto geral, os efeitos alelopáticos, abrangem as interações bioquímicas, tanto de estímulos quanto de inibição de crescimento, entre diferentes produtores primários ou entre estes e microorganismos (MOLISCH, 1937; RICE, 1984). Alguns estudos vêm demonstrando que as cianotoxinas atuam, principalmente, como compostos alelopáticos contra os competidores naturais das cianobactérias exercendo efeito de redução de crescimento, no conteúdo de clorofila e da capacidade fotossintética (PIETSCH et al., 2001; KEARNS e HUNTER, 2000, 2001; PFLUGMACHER, 2004). Esses estudos experimentais são baseados principalmente em microcistinas.

As microcistinas são conhecidas como metabólitos secundários extremamente tóxicos que podem ser produzidos por gêneros de cianobactérias comumente formadoras de florações (*Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*) (SIVONEN e JONES, 1999). Em ambientes naturais os níveis de toxicidade das microcistinas são medidos através das suas concentrações no meio aquático. Os estudos mostram que as concentrações de microcistinas em ecossistemas de água doce geralmente são menores de $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$, exceto durante colapsos de florações (Tabela 1). Poucos trabalhos revelaram os efeitos das microcistinas em concentrações geralmente encontradas nos ambientes naturais (KEARNS e HUNTER, 2000, 2001; PIETSCH et al., 2001; HU et al., 2004). Em contrapartida, um maior número de estudos evidenciou alterações de crescimento de espécies fitoplanctônicas, ocasionado pelas microcistinas, em altas concentrações que não são usualmente encontradas no meio ambiente (SEDMAK e KOSI,

1998; SINGH et al., 2001; VARDI et al., 2002; HU et al., 2004, 2005; SUIKKANEN et al., 2004; OU et al., 2005; BABICA et al., 2007).

Tabela 1. Estudos que investigaram as concentrações de microcistinas em ambientes naturais e as respectivas concentrações encontradas (SIVONEN e JONES, 1999).

Local	Concentração de microcistinas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Método de análise	Referência
Austrália	3,0 – 1.800	HPLC	Jones e Orr (1994)
Estados Unidos	0,07 - 200	ELISA	McDermott et al. (1995)
China	0,05 – 1,60	ELISA	Ueno et al. (1996a)
Alemanha	0,07 – 0,76	ELISA	Ueno et al. (1996b)
Tailândia	0,08 – 0,35	ELISA	Ueno et al. (1996b)
Japão	0,02 – 3,80	HPLC	Tsuji et al. (1996)
Japão	5,60	ELISA	Ueno et al. (1996b)
Finlândia	0,06 – 0,21	HPLC e ELISA	Lahti et al. (1997)
Japão	0,08 – 0,80	ELISA	Nagata et al. (1997)

Nesse panorama, acredita-se que concentrações de microcistinas ambientalmente relevantes, ou seja, aquelas usualmente encontradas nos ambientes naturais não alteram o crescimento de competidores naturais das cianobactérias (BABICA et al., 2006).

Dessa forma, no intuito de contribuir para o conhecimento sobre a função natural das cianotoxinas nossa pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos das microcistinas sob condições controladas, em concentrações usualmente encontradas em condições naturais, sobre o crescimento das microalgas verdes frequentemente encontradas na comunidade fitoplanctônica junta a espécies produtoras de microcistinas: *Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová e *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat sob.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALELOPATIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

A alelopatia trata-se de um fenômeno em crescente investigação nos ambientes aquáticos. Leflaive e Ten-Hage (2007) afirmam que para esses ambientes o papel ecológico dos compostos alelopáticos esta cada vez mais claro dentro das comunidades fitoplanctônicas, pois essas substâncias atuam em eventos de sucessão ecológica e na formação de florações de microalgas nos ambientes naturais.

De acordo com esses autores, a sucessão de espécies fitoplanctônicas tem sido explicada como uma consequência da competição e que o período de dominância de uma espécie depende diretamente da sua capacidade competitiva. Wolfe (2000) afirma que uma espécie que produz compostos alelopáticos tem vantagens sobre seus concorrentes. O que corrobora que a alelopatia explica, em parte, a sucessão de espécies nos ambientes aquáticos.

2.2. A ALELOPATIA E AS FLORAÇÕES DE FITOPLANCTÔNICAS

Alguns estudos descrevem a sucessão de microalgas e a formação de florações de espécies fitoplanctônicas relacionadas com a produção de compostos alelopáticos (RENGEFORS e LEGRAND, 2001; TAKAMO et al., 2003; CHIANG et al., 2004).

Rengefors e Legrand (2001) evidenciaram que o dinoflagelado de água doce *Peridinium aciculiferum* Lemmermann produz algum composto alelopático causador de lise celular no seu concorrente natural, *Rhodomonas lacustris* Pascher & Ruttner. A produção de composto alelopático foi referenciado como uma maneira de compensar a desvantagem competitiva (baixa taxa de crescimento e baixa absorção de crescimento) de *P. aciculiferum* devido a seu grande tamanho, favorecendo a sua dominância. Além disso, as células de *R. lacustris* lisadas liberam nutrientes que suportam o crescimento desse dinoflagelado.

O estudo realizado por Takamo et al. (2003) compararam o crescimento da cianobactéria *Phormidium tenue* (Meneghini) Gomont na presença de diatomáceas, com e sem germânio, um inibidor de crescimento de diatomáceas. Os autores demonstraram que o crescimento de *P. tenue* foi inibido com aumento da biomassa das diatomáceas. Em contrapartida, quando adicionado o inibidor de crescimento de diatomáceas (germânio) *P. tenue* se desenvolvia normalmente. Contudo, não foi identificada qualquer substância produzida pelas diatomáceas.

Durante florações da microalga verde *Botryococcus braunii* Kützing, há liberação ácidos graxos livres com efeitos adversos sobre o fitoplâncton e várias espécies de zooplâncton (CHIANG et al., 2004). Durante essas florações, Chiang et al. (2004) observaram correlação negativa entre densidade de espécies fitoplanctônicas e zooplanctônicas e a concentração de ácidos graxos livres. Estes resultados sugerem uma relação entre a formação e o desaparecimento de florações e a produção de compostos alelopáticos que elimina os competidores e predadores.

2.3. SUBSTÂNCIAS ALELOPÁTICAS E CIANOTOXINAS

De maneira geral, os compostos alelopáticos incluem ácidos graxos, alcalóides, peptídeos cíclicos, terpenos e compostos orgânicos voláteis, e apresenta diversos modos de ação: inibição de fotossíntese (SMITH e DOAN, 1999), inibição de enzimas (JÜTTNER e WU, 2000), paralisia celular (KEARNS e HUNTER, 2001) e inibição na síntese do ácido nucléico (DOAN et al., 2000). Alguns compostos alelopáticos já foram isolados a partir de cianobactérias, tais: fischerelinas, hapalindoles, calothrixinas, kasumigamide, nostocyclamides e microcina SF608 (PAPKE et al., 1997; DOAN et al., 2000; ISHIDA e MURAKAMI, 2000; JÜTTNER et al., 2001; WIEGAND et al., 2002).

Sobre a cianotoxinas sabe-se que incluem alcalóides, peptídeos cíclicos e lipopolissacarídeos e se caracterizam por serem inibidores de enzimas e por interferir nos receptores de membrana celular (CHORUS e BARTRAM, 1999). A classificação destes compostos ocorre pela sua ação tóxica sobre diversos organismos. As principais cianotoxinas identificadas são: anatoxina-a, anatoxina-a (s), cilindrospermopsina, saxitoxinas, neosaxitoxinas, nodularina e microcistinas (SIVONEN e JONES, 1999).

2.4. EVIDÊNCIAS ALELOPÁTICAS DAS MICROCISTINAS

Para as cianotoxinas as primeiras evidências que essas substâncias poderiam atuar como compostos alelopáticos, foi registrada por Sedmak e Kosi (1998). Quando esses autores observaram correlação negativa entre concentrações de cianotoxinas (microcistinas) e diversidade fitoplanctônica no lago Bled na Eslovênia.

Diversos trabalhos iniciaram a investigação da ação alelopática das cianotoxinas, principalmente das microcistinas, em competidores naturais das cianobactérias. Entre essas investigações as microcistinas revelaram claros efeitos sobre plantas aquáticas, incluindo a redução no crescimento, conteúdo de clorofila e capacidade fotossintética, bem como

alterações na composição de pigmentos das plantas (CASANOVA et al, 1999; WEISS et al, 2000; PFLUGMACHER, 2002).

Pflugmacher (2002) observou o efeito alelopático da microcistina-LR sobre plantas aquáticas, na concentração de 0,1 a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em um ecossistema aquático, baseando-se nos resultados de produção de oxigênio fotossintético, no padrão de clorofila *a* e *b* e de taxa de crescimento dessas plantas.

Mitrovic et al. (2005) observaram redução no crescimento e aumento da atividade da enzima peroxidase nas plantas aquáticas livre flutuantes *Lemna minor* L. e *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel. ex Wimm. expostas durante cinco dias a concentrações de 10.000 a 20.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR.

Nos estudos com microalgas, Sedmak e Kosi (1998) observaram, de um lado, que o crescimento *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komàrková-Legnerová, *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing foi estimulado quando expostas a concentrações de microcistinas entre 104-509 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, as espécies *Cryptomonas erosa* Ehrenberg, *Coelastrum microporum* Nägeli e *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli além de apresentaram inibição de crescimento, tiveram suas células degradadas quando expostas as mesmas concentrações.

Singh et al. (2001) observaram inibição de crescimento e lise celular nas cepas de *Anabaena* sp. BT1 e *Nostoc muscorum* C. Agardh quando expostas a concentrações de microcistinas-LR entre 25-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante seis dias, produzidas pela cianobactéria *M. aeruginosa*.

Vardi et al. (2002) verificaram que a microcistina-LR em concentrações em torno de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ provocam inibição da fotossíntese e efeitos na atividade da proteína quinase no dinoflagelado *Peridinium gutanense* Nygaard.

Ou et al. (2005) observaram que a espécie *Poterochromonas* sp. (Chrysophyceae) teve o crescimento estimulado quando expostas as microcistinas-LR e microcistinas-RR entre 100-4.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após observarem que a taxa de crescimento desta espécie foi elevada de 4 a 5 vezes em relação ao controle, indicando que as toxinas servem como estímulo de crescimento para este organismo.

Nos experimentos realizados por Babica et al. (2007) foram testadas diferentes concentrações das microcistina-LR e RR (1 – 25.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sobre cinco representantes das microalgas verdes. As espécies alvos apresentaram diferentes respostas quando expostas a microcistinas-RR ou LR. Porém baixas concentrações de microcistinas (1 – 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) não

causaram alterações significativas sobre o crescimento das algas verdes. *Scenedesmus quadricauda* apresentou inibição de crescimento em elevadas concentrações de microcistinas ($25.000 \mu\text{g.L}^{-1}$). Apenas para *Chlamydomonas reinhardtii* Dang e *Pediastrum duplex* Meyen foram observadas diferentes respostas para as variantes de microcistinas testadas, porém em concentrações altas.

Poucos estudos mostraram efeitos alelopáticos das microcistinas, em concentrações encontradas nos ambientes naturais (ver tabela 1), salvo exceções relatadas nos trabalhos de Kearns e Hunter (2000; 2001), Pietsch et al. (2001) e Hu et al. (2004).

Kearns e Hunter (2000; 2001) verificaram que a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (UTEX 90) é sensível a baixas concentrações microcistinas ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e anatoxina-a ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) semi-purificadas, extraídas de *Anabaena flos-aquae* Brébisson ex Bornet & Flauhault (UTEX 1444). Os autores atribuíram às cianotoxinas a responsabilidade pela redução da mobilidade, a inibição do crescimento de *C. reinhardtii*, além da paralisia nas células, que ocasionou a sedimentação, influenciando na distribuição vertical deste táxon.

Pietsch et al. (2001) constataram que a alga verde *Scenedesmus armatus* (Chod.) GM Smith quando exposta ao extrato bruto de cianobactérias numa concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas sofrem redução da fotossíntese e elevação da enzima peroxidase.

Em um experimento curto com a cianobactéria *Synechococcus elongatus* (Nägeli) Nägeli, Hu et al. (2004) observaram que microcistina-RR na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ causou alterações não significativas no crescimento e na fisiologia dessa linhagem. Os efeitos mais pronunciados e significativos só foram evidenciados em concentrações mais elevadas ($100 - 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Hu et al. 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 9–20. 2006.
- BABICA, P.; HILSCHEROVÁ, K.; BÁRTOVÁ, K.; BLÁHA, L.; MARSÁLEK, B. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. **Phycologia**, v. 46, p. 137–142. 2007.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA R. Cianobactéria Invasora - Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 82-90. 2003.
- CARMICHAEL, W.W. **Status report on planktonic cyanobacteria (bluegreen algae) and their toxins**. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. 149p. 1992.
- CARMICHAEL, W. W. The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p. 78-86. 1994.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. E e FN Spon, London. 416p. 1999.
- CHIANG I.-Z.; HUANG W.-Y.; WU J.-T. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 40, p. 474–480. 2004.
- CODD, G.A.; BELL, S.G.; KAYA, K.; WARD, C.J.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, p. 405-415. 1999.
- DOAN, N. T.; RICKARDS, R.W.; ROTHSCHILD, J.M.; SMITH, G. D. Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.409–416, 2000.
- HU, Z. Q.; LIU, Y. D.; LI, D. H. Physiological and biochemical microcystin-RR toxicity to the *Synechococcus elongatus*. **Environmental Toxicology**, v. 19, p. 571–7. 2004.
- HU, Z.Q.; LIU, Y.D.; LI, D.H.; DAUTA, A. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. **Hydrobiologia**, v. 534, p. 9-23. 2005.

ISHIDA, K.; MURAKAMI, M. Kasumigamide, an antialgal peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p.898–900, 2000.

JANG, M.-H.; JOO, G.-J.; TAKAMURA, N. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 1540–1550. 2003.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.M.D.; ANTUNES, M.B.D.; DE MELO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialyses center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 873-878. 1998.

JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lakes, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. **Water Research**, v. 28, p. 871-876. 1994.

JONSSON, P.R.; PAIVA, H.; TOTH, G. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 11177-11182. 2009.

JÜTTNER, F.; WU, J.-T. Evidence of allelochemical activity in subtropical cyanobacterial biofilms of Taiwan. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 147, p. 505–517. 2000.

JÜTTNER, F.; TODOROVA, A. K.; WALCH, N.; VON PHILIPSBORN, W. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. **Phytochemistry**, v.57, p.613–9, 2001.

KEARNES, K.D.; HUNTER, M.D. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 291–297. 2000.

KEARNS, K.D.; HUNTER, M.D. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. **Microbial Ecology**, v. 42, p. 61-80. 2001.

LAHTI, K.; RAPALA, J.; FÄRDIG, M.; NIEMELÄ, M.; SIVONEN, K. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, in particulate material and dissolved in lake water. **Water Research**, v. 31, p. 1005-1012. 1997.

LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, v. 52, p. 199-214. 2007.

McDERMOTT, C.M.; FEOLA, R.; PLUDE, J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. **Toxicon**, v. 33, p. 1433-1442. 1995.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere: Allelopathie**. Fischer Verlag, Jena, 1937.

MITROVIC, S.M.; ALLIS, O.; FUREY, A.; JAMES, K.J. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 345–352. 2005.

NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; UENO, Y.; WATANABE, M.F. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 80, p. 408-417. 1997.

OU, D. Y. ; SONG, L. R. ; GAN, N. Q. ; CHEN, W. Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poteroiochromonas* sp. **Environmental Toxicology**, v. 20, p. 373–380. 2005.

PAPKE, U.; GROSS, E. M.; FRANCKE, W. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret.). **Tetrahedron Letters**, v.38, p.379–82, 1997.

PIRES, L.M.D.; VAN DONK, E. Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. **Environmental Toxicology**, v. 47, p. 1855–1865. 2002.

PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AME, M. V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environmental Toxicology**, v.16, p.535–42, 2001.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 407–13. 2002.

PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 169–178. 2004.

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

RICE, E.L. **Allelopathy**. Academic Press, New York, 1984.

SEDMAK, B.; KOSI, G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. **Journal Plankton Research**, v. 20, p. 691–708. 1998.

SHAPIRO, J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v. 24, p. 38-54. 1990.

SINGH, D. P.; TYAGI, M. B.; KUMAR, A.; THAKUR, J. K.; KUMAR, A. Antialgal activity of a hepatotoxin producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 15–22. 2001.

SIVONEN, K.K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In Chorus, I.; Bartram, J. (eds.) **Toxic Cyanobacteria in Water**. Spon, London, p. 41– 111. 1999.

SMITH, P.T. Light and nutrients effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic**, v. 43, p. 148-153. 1996.

SMITH, G.D.; DOAN, N.T. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. **Journal Applied Phycology**, v. 11, p. 337–344, 1999.

SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G.O.; GRANALI, E. Allelopathic effects of the baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 308, p. 85–101. 2004.

TAKAMO, K.; IGARASHI S.; MIKAMI H.; HINO S. Causation of reversal simultaneity for diatom biomass and density of *Phormidium tenue* during the warm season in eutrophic Lake Barato, Japan. **Limnology**, v.4, p.73–78. 2003.

TSUJI, K.; SETSUDA, S.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; HARADA, K.I. Microcystin levels during 1992-95 for lakes Sagami and Tsukui Japan. **Natural Toxins**, v. 4, p. 189-194. 1996.

UENO, Y.; NAGATA, S. TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.D.; CHEN, G.C.; CHEN, G.; YU, S.Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1317-1321. 1996a.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; SUTTAJIT, M.; PUTSCH, M.; VASCONCELOS, V. Survey of microcystins in environmental water by a highly sensitive immunoassay based on monoclonal antibody. **Natural Toxins**, v. 4, p. 271-276. 1996b.

VARDI, A.; SCHATZ, D.; BEERI, K.; MOTRO, U.; SUKENIK, A.; LEVINE, A.; KAPLAN, A. Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. **Current Biology**, v. 12, p. 1767-72. 2002.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, v. 48, p. 627-640. 2006.

WIEGAND, C.; PEUTHERT S.; PFLUGMACHER S.; CARMELI S. Effect of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. **Environmental Toxicology**, v.17, p.400-406, 2002.

WOLFE, G.V. The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: constraints, mechanisms, and impacts. **Biological Bulletin**, v. 198, p. 225-244. 2000.

MANUSCRITO

BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE MICROCISTINAS NÃO CAUSAM EFEITOS ALELOPÁTICOS SOBRE O
CRESCIMENTO DE MICROALGAS VERDES

O MANUSCRITO SERÁ SUBMETIDO AO **JOURNAL OF PHYCOLOGY**



Baixas concentrações de microcistinas não causam efeitos alelopáticos sobre o crescimento de
microalgas verdes¹

Helton Soriano Bezerra de Oliveira

Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de
Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brasil

Ariadne do Nascimento Moura

Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de
Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brasil

Renato José Reis Molica

Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom
Pastor s/n. CEP 55292-270. Garanhuns, PE, Brasil

Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira²

Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Piracicaba, SP, 13418-900 Brasil

²Autor para correspondência: Email: mbitt@esalq.usp.br; Fone: +5519-3429-4128, Fax:
+5519-3434-8295.

Título condensado: Efeitos das microcistinas sobre o crescimento de microalgas verdes

1. RESUMO

Alguns estudos em laboratório mostram que as microcistinas exercem efeitos alelopáticos sobre organismos da biota aquática. No entanto, os desenhos experimentais testam concentrações dificilmente encontradas nos ambientes naturais (acima de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), o que torna imprecisa a afirmação das microcistinas atuarem como compostos alelopáticos. Nosso estudo teve por objetivo avaliar os efeitos das microcistinas, em concentrações usualmente encontradas em condições naturais, sobre o crescimento de linhagens de microalgas verdes (*Monoraphidium convolutum* e *Scenedesmus acuminatus*). Para tanto foram realizados cultivos mistos, entre cianobactérias e microalgas verdes e cultivos dessas microalgas verdes com adição de extratos brutos de cianobactérias produtoras e não-produtoras de microcistinas. Foram utilizadas duas linhagens clonais não-axênicas de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (produtora de microcistinas – MC+) e *Microcystis panniformis* (não-produtora – MC-). Os experimentos foram desenvolvidos sob condições controladas em laboratório. Foi observado que em cultivos mistos, tanto as microalgas verdes quanto as cianobactérias apresentam redução de crescimento, atribuída a alterações na taxa de crescimento específico. *M. aeruginosa* (MC+) teve a produção de microcistinas elevada no cultivo com *M. convolutum*, no entanto com *S. acuminatus* a produção não foi alterada. O crescimento das microalgas verdes, não foi alterado nos tratamentos com adição de extrato brutos de células de *M. aeruginosa* (MC+) $5\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas totais. Igualmente, para os tratamentos com extratos *M. panniformis* (MC-) o crescimento dessas microalgas verdes não foram alterados. Os nossos resultados não suportam a hipótese da função alelopática das microcistinas, pelo menos sobre o crescimento dessas microalgas verdes.

Palavras-chave: alelopatia; cianobactéria; cultivos mistos; *Microcystis*; produção de microcistinas

2. INTRODUÇÃO

A alelopatia se caracteriza como mecanismo de competição por interferência, mediada quimicamente, comumente evidenciada nos ambientes aquáticos (Leflaive e Ten-Hage 2007). E abrange qualquer efeito de estímulo ou inibição de plantas terrestres e aquáticas, bactérias, fungos ou microalgas sobre o crescimento de um organismo alvo (Rice 1984). Os crescentes estudos experimentais mostram que substâncias como as cianotoxinas, encontradas nos ambientes aquáticos de água doce, apresentam efeitos alelopáticos em competidores diretos (microalgas e plantas aquáticas) das cianobactérias (Pietsch et al. 2001, Kearns e Hunter 2000, 2001, Pflugmacher 2004).

Os desenhos experimentais, em trabalhos de alelopatia com cianotoxinas, são baseados principalmente com microcistinas, que são conhecidas pela sua alta toxicidade para mamíferos (hepatotóxica), com registros de incidentes com humanos e animais (Jochimsen et al. 1998, Codd et al. 1999, Yuan et al. 2006). E por serem compostos produzidos por gêneros de cianobactérias comumente encontradas nos ambientes naturais e formadoras de florações (*Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*) (Sivonen e Jones 1999).

Poucos estudos registraram efeitos das microcistinas em concentrações semelhantes às encontradas nos ambientes naturais (Kearns e Hunter 2000, 2001, Pietsch et al. 2001, Hu et al. 2004). Em contrapartida, grande parte dos estudos observou alterações de crescimento de espécies fitoplanctônicas ocasionada pela exposição a altas concentrações microcistinas (Sedmak & Kosi 1998, Singh et al. 2001, Vardi et al. 2002, Hu et al. 2004, Suikkanen et al. 2004, Ou et al. 2005, Babica et al. 2007).

De acordo com a revisão realizada por Sivonen e Jones (Sivonen e Jones 1999) as concentrações de microcistinas encontradas em ecossistemas aquáticos são menores que $10,0\mu\text{g.L}^{-1}$, exceto durante colapsos de florações. Com base nesses relatos e nos resultados encontrados em pesquisas anteriores, nosso estudo testou a hipótese de que as concentrações

de microcistinas encontradas nos ambientes naturais não são capazes de alterar o crescimento de seus concorrentes diretos (Babica et al., 2006).

E tem como objetivo investigar os efeitos microcistinas sobre o crescimento de duas microalgas verdes, em duas faixas de concentrações, semelhantes às encontradas nos ambientes naturais. As seguintes espécies de microalgas verdes foram testadas nos experimentos: *Monoraphidium convolutum* (Corda) Komárková-Legnerová e *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat, duas espécies frequentemente encontrada na comunidade fitoplanctônica junta a espécies produtoras de microcistinas. Além de serem dois táxons que não foram testados em experimentos semelhantes. Para as cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing e *Microcystis panniformis* Komárek et al. por serem produtora e não-produtora de microcistinas, respectivamente (Bittencourt-Oliveira 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens e condições de cultivos

Foram utilizadas duas linhagens clonais e não-axênicas de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (BCCUSP232) produtora de microcistinas (MC+) e *Microcystis panniformis* Komárek et al. (BCCUSP200) não-produtora (MC-) (Bittencourt-Oliveira 2003), pertencentes ao *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*, e duas de microalgas verdes, *Monoraphidium convolutum* (CMEA/UFF0201) da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar e *Scenedesmus acuminatus* (UFSCar036) da Universidade Federal de São Carlos.

Todos os experimentos foram realizados em erlenmeyers com capacidade de 1.000 mL, com 600 mL de volume final de cultura, em meio BG-11, pH 7,4, segundo Rippka et al. (1979) modificado por Bittencourt-Oliveira (2000) pela substituição do ferro citrato de

amônia por cloreto férrico $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os experimentos foram realizados em câmaras climáticas nas condições de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro) e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (fotômetro LI-COR, mod. LI-250, com sensor esférico subaquático).

3.2. Obtenção de Biomassa de Cianobactérias

Para a obtenção de biomassa das cianobactérias e das algas verdes necessária aos experimentos (descrito posteriormente no item 3.5.b), foram cultivados, por linhagem, aproximadamente 20 litros (L) de cultivos nas condições e meio descritos no item 3.1. O crescimento ocorreu em diferentes erlemmeyers, entretanto, antes de serem submetidos à centrifugação (etapa posterior) procedeu-se a homogeneização de todo o volume cultivado a fim de garantir a uniformidade da biomassa resultante. O material resultante foi centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos à temperatura de 20°C . Posteriormente, os centrifugados foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o processo de liofilização e para as cianobactérias produtora de tóxica seguiu com a análise das concentrações de microcistinas por peso de massa seca (ver item 7.4). Após a liofilização o material foi estocado em freezer a -20°C .

3.3. Análises de Microcistinas

As concentrações de microcistinas foram determinadas através da técnica imunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), com utilização do kit BEACON microcistinas, placa para quantificação de microcistinas em água (Beacon Analytical Systems Inc.) de acordo com instruções do fabricante. As análises foram realizadas com auxílio de uma leitora de microplaca (ASYS Hitech GmbH, Nordstrasse 4, modelo A – 5301 Eugendorf, Áustria). A faixa de detecção dos ensaios foi de 0,10 a 2,0 partes por bilhão (PPB) ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). Previamente as análises, as amostras foram sonicadas (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) para rompimento das células.

3.4. Obtenção dos Extratos Brutos das Linhagens de Cianobactérias

As massas liofilizadas com peso correspondentes às concentrações de MC totais a serem utilizadas em cada experimento (ver Tabela 2) foram ressuspensas em tubos de vidro âmbar com 3mL água deionizada esterilizada e ultrassonicadas (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) em banho de gelo por cinco minutos (15W e 22,5kHz) para o rompimento das células. Estes extratos foram utilizados imediatamente. O mesmo procedimento foi realizado para a linhagem não tóxica. Entretanto, para essa, as massas usadas corresponderam ao peso (mg) das massas utilizadas para linhagem tóxica.

3.5. Experimento de Interações Alelopáticas

3.5.a. Microalgas verdes X Cianobactéria

Para examinar os possíveis efeitos alelopáticos entre cianobactérias (*M. aeruginosa* (MC+) e *M. panniformis* (MC-)) e microalgas verdes (*M. convolutum* e *S. acuminatus*), foram realizados cultivos mistos com células intactas: *M. aeruginosa* (MC+) com *M. convolutum*, *M. aeruginosa* (MC+) com *S. acuminatus*, *M. panniformis* (MC-) com *M. convolutum* e *M. panniformis* (MC-) com *S. acuminatus*.

As culturas foram iniciadas com densidade de células na proporção de 1:1, com $7,0 \times 10^5$ cel.mL⁻¹ e $1,0 \times 10^5$ cel.mL⁻¹ nos tratamentos com *M. convolutum* e *S. acuminatus*, respectivamente. Para cada linhagem foi realizado seu respectivo controle (unialgais). O acompanhamento do crescimento das duas espécies foi diário e ocorreu durante 10 dias, a partir da contagem do número de células.

Para avaliar a influência das microalgas verdes na produção de microcistinas, foram coletadas amostras, concomitantemente as retiradas para as contagens, no 1º, 7º e 10º dia. As análises das concentrações de microcistinas foram realizadas de acordo com o descrito no

item 3.3. Nos cultivos de microalgas verdes com a linhagem não-tóxica (BCCUSP200) foram retirados os mesmos volumes a fim de manter as mesmas condições e volume das culturas.

3.5.b. Microalgas verdes X Extratos Brutos de Cianobactérias

Para avaliar se microcistinas afetam o crescimento de microalgas verdes, foram desenvolvidos experimentos de alelopátia conforme a Tabela 2, com tratamentos distintos tanto para *M. convolutum* como para *S. acuminatus*, utilizando linhagem produtora e não-produtora de microcistinas, em triplicata.

Os cultivos das microalgas verdes foram iniciados a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ cél.mL⁻¹ e mantidos nas condições descritas anteriormente. A adição dos extratos brutos foi realizada 3 dias após o inóculo inicial. As massas de extratos brutos adicionadas aos cultivos das microalgas verdes corresponderão às concentrações de MC desejada (5,0 e 10,0 µg.L⁻¹). A determinação das concentrações de microcistinas nos extratos brutos utilizados foi de acordo como procedimento descrito no item 3.3. Para as linhagem não produtora de microcistinas foi adicionado ao cultivo das microalgas verdes os extratos brutos nas mesmas proporções (massa seca) da linhagem produtora de microcistinas.

Os efeitos alelopáticos foram testados a partir do acompanhamento do crescimento das microalgas verdes, realizado durante 10 dias com a contagem do número de células.

3.6. Densidade celular e taxa de crescimento

O crescimento das linhagens foi determinado pela contagem do número de células, utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal com auxílio de um microscópio binocular (Nikon E200, Melville, NY, USA), seguindo a metodologia de Guillard (1973). A taxa de crescimento específico (μ) foi obtida de acordo com Fogg e Thake (1987).

3.7. Análise Estatística

A partir dos resultados obtidos, para cada experimento, foi realizada a análise de medidas repetidas lineares de modelo geral (GML) e teste de Tukey (SAS Institute Inc., versão 9.2). Foi considerado com variação significativa para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Tanto as cianobactérias (*M. aeruginosa* (MC+) e *M. panniformis* (MC-)) quanto às microalgas verdes (*M. convolutum* e *S. acuminatus*) apresentaram redução significativa de crescimento em comparação aos seus respectivos controle ($p < 0,05$). (Fig. 1).

Conseqüentemente, as taxas de crescimento específico das cianobactérias (*M. aeruginosa* (MC+) e *M. panniformis* (MC-)) e microalgas verdes (*M. convolutum* e *S. acuminatus*) reduziram significativamente nos cultivos mistos ($p < 0,05$) (Fig. 2).

Ao longo do experimento, *M. aeruginosa* (MC+) mostrou diferentes respostas sobre a concentração de microcistinas totais por cota celular nos cultivos mistos com *M. convolutum* e *S. acuminatus*. A concentração de microcistinas por cota celular no cultivo misto com *M. convolutum* aumentou significativamente em comparação ao controle ($F = 15,42$; $p < 0,05$) (Figura 3A). No entanto, com *S. acuminatus* a concentração de microcistinas totais por cota celular não variou em relação ao controle ($F = 0,14$; $p = 0,710$) (Fig. 3B).

Nos cultivos unialgais de *M. aeruginosa* (MC+) (controle) observou-se a relação inversa entre a densidade celular e a concentração de MC totais por cota celular (Figura 3A e 3B).

O crescimento das microalgas verdes (*M. convolutum* e *S. acuminatus*) não foi alterado com adição de extrato brutos de células de *M. aeruginosa* (MC+) com $5\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas totais ($p < 0,05$). Nos tratamentos com adição dos extratos de *M. panniformis* (MC-). Igualmente, para os tratamentos com extratos *M. panniformis* (MC-) os

crescimentos de *M. convolutum* e *S. acuminatus* não foram alterados com a massa correspondente a da linhagem produtora de microcistinas para as concentrações de $5\mu\text{g.L}^{-1}$ e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p > 0,05$) (Fig. 4).

5. DISCUSSÃO

Os experimentos mostraram que o crescimento de todas as linhagens testadas foi significativamente reduzido nos cultivos mistos (Fig. 1). Esses resultados são atribuídos as reduções nas taxas de crescimento dessas linhagens (Fig. 2). A taxa de crescimento é reduzida na presença de um competidor (Li e Li 2010), como observado por Oberhaus et al. (2007) ao realizarem monoculturas e experimentos de competição, com linhagens de cianobactérias *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek e *P. rubescens* (De Candolle ex Gomont) Anagnostidis & Komárek.

A alteração nas taxas de crescimento das linhagens estudadas pode ser explicada pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Em vista que Chu et al. (2007) comprovou que a limitação de nitrogênio e/ou fósforo reduz e altera as fases de crescimento de uma linhagem de *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner. No nosso estudo as concentrações de nutrientes não foram avaliadas, no que se diz respeito à disponibilidade e absorção. Entretanto, acreditamos que nos cultivos controle a disponibilidade de nutrientes é maior em relação aos cultivos mistos, em vez que nesse último estão presentes duas linhagens com crescimento ativo, o que conseqüentemente aumenta o consumo de nutrientes.

De fato, nos experimentos de cultivos mistos a competição por recursos ocorre e interfere no crescimento das linhagens envolvidas (Oberhaus et al. 2007). Entretanto, nesses tipos de experimentos, excluir as interações bioquímicas, e conseqüentemente os possíveis efeitos alelopáticos, torna-se impraticável (Inderjit e Del Moral 1997).

Entretanto, ao longo dos nossos experimentos, *Microcystis aeruginosa* (MC+) mostrou aumento significativo na produção de microcistinas quando cultivada com *M. convolutum* (Fig. 3). Esse fenômeno resulta possivelmente do efeito alelopático das microcistinas produzidas por *M. aeruginosa*. De acordo com Jang et al. (2006) o aumento da produção de microcistinas na presença de um competidor representa uma resposta alelopática. Alguns estudos mostram que a produção de microcistinas é elevada na presença de concorrentes naturais (Jang et al. 2006; 2007, Leflaive e Ten-Hage 2007, Li e Li 2010) e que esse evento trata-se de um mecanismo de competição. Dessa forma, *M. aeruginosa* teria usado essa capacidade para inibir o crescimento de *M. convolutum*. No entanto, *M. aeruginosa* não alterou a produção de microcistinas na presença de *S. acuminatus*, e mesmo assim o crescimento dessa linhagem foi reduzido, o que não corrobora com a hipótese da alelopatia.

Os resultados dos nossos experimentos mostraram que à exposição a células de *Microcystis* reduz o crescimento das microalgas verdes, independente da capacidade destas de produzirem microcistinas. No entanto, a exposição a extratos de *M. aeruginosa* (MC+), nas concentrações de microcistinas testadas (5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), foram ineficazes ou causaram fracas alterações no crescimento de *M. convolutum* e *S. acuminatus* (Fig. 4). Alguns estudos investigaram os efeitos de microcistinas em microalgas dentro da faixa de concentrações encontradas nos ambientes naturais. Kearns e Hunter (2000) observaram inibição de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. à exposição a extratos semi-purificados de *Anabaena flos-aquae* Brébisson ex Bornet & Flauhault com microcistinas em concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A mesma concentração de microcistina-LR purificada causou sedimentação e inibição da mobilidade de *C. reinhardtii* (Kearns e Hunter 2001). Possivelmente os efeitos da inibição de crescimento observado por Kearns e Hunter (2000) podem ter sido causado por outro composto bioativo, potencialmente presente no extrato de *A. flos-aquae*, não presente nos nossos extratos, obtidos a partir de linhagens de *Microcystis*. Outra possível explicação é *C. reinhardtii* ser mais susceptível as microcistinas em comparação a *M. convolutum* e *S.*

acuminatus. Babica et al. (2007) sugerem que os efeitos das microcistinas no fitoplâncton é específico para cada espécie.

A exposição a microcistinas-LR ou RR, em concentrações de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$, durante um experimento de curta duração, reduziu a fotossíntese e elevou atividade da enzima peroxidase na microalga verde *Scenedesmus armatus* (Chodat) Smith (Pietsch et al. 2001). Hu et al. (2004) observaram que concentrações de microcistinas-RR ($10\mu\text{g.L}^{-1}$) causaram fracos estímulos, não-significativos, sobre o crescimento e fisiologia (mudanças no conteúdo de pigmentos, carboidratos e proteínas, inibição da fotossíntese) da cianobactéria *Synechococcus elongatus* (Nägeli) Nägeli. Há evidências de que microcistinas são capazes de afetar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em microalgas, em concentrações encontradas nos ambientes naturais, no entanto, raramente foi observada alterações de crescimento (Babica et al. 2007). Esses resultados sobre os efeitos das microcistinas sobre o crescimento de microalgas corroboram com o nosso estudo.

Babica et al. (2007) observaram que concentrações abaixo de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas foram ineficazes sobre o crescimento de cinco espécies de microalgas. Assim como observado em nossa pesquisa. No entanto, encontraram efeitos significativos em concentrações elevadas ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$), para algumas linhagens e para diferentes variantes de microcistinas (RR e LR). Outros estudos mostraram que apenas elevadas concentrações de microcistinas causam efeitos sobre o crescimento de microalgas sob condições controladas, em contrapartida a baixas concentrações testadas (Singh et al. 2001, Vardi et al. 2002, Suikkanen et al. 2004, Ou et al. 2005, Hu et al. 2004).

De maneira geral, nossos resultados, e assim como observados por outros estudos (Kearns e Hunter 2000; 2001; Pietsch et al. 2001, Babica et al. 2007), não suportam a hipótese da função alelopática das microcistinas, pelo menos sobre o crescimento de outras microalgas.

6. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao projeto CNPq /CT-Hidro nº 576890/2008-1, e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

7. REFERÊNCIAS

- Babica, P., Bláha, L. & Marsalek, B. 2006. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42:9–20.
- Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L. & Marsálek, B. 2007. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia.* 46:137–142.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., 2000. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz. (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algol. Stud.* 99:29-37.
- Bittencourt-Oliveira, M.C. 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae.* 2:51–60.
- Chu, Z., Jin, X., Yang, B. & Zeng, Q. 2007. Buoyancy regulation of *Microcystis flos-aquae* during phosphorus-limited and nitrogen-limited growth. *J. Plankton Res.* 29:739-745.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A. & Metcalf, J.S. 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.* 34:405-415.
- Fogg G.E. & Thake, B. 1987. Algal cultures and phytoplankton ecology. University Wisconsin Press, Madison.

- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates, In: Stein, J. (ED), *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-311.
- HU, Z. Q.; LIU, Y. D.; LI, D. H. 2004. Physiological and biochemical microcystin-RR toxicity to the *Synechococcus elongatus*. *Environmental Toxicology*, 19:571–7.
- Inderjit & Del Moral, R. 1997. Is Separating Resource Competition from Allelopathy Realistic? *The Bot. Review*. 63:221-230.
- Jang, M.-H., Ha, K., Jung, J.-M., Lee, Y.-J. & Takamura, N. 2006. Increased microcystin production of *Microcystis aeruginosa* by indirect exposure of nontoxic cyanobacteria: potential role in the development of *Microcystis* bloom. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76:957–962.
- Jang, M.-H., Ha, K. & Takamura, N. 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*. 49:727-733.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.M.D., Antunes, M.B.D., De Melo, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O. & Jarvis, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialyses center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338:873-878.
- Kearnes, K.D. & Hunter, M.D. 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environ. Microbiol.* 2:291–7.
- Kearns, K.D. & Hunter, M.D. 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial. Ecol.* 42:61-80.

- Leflaive, J. & Ten-Hage, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52:199-214.
- Li, Y. & Li, D. 2011. Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabaena* PCC7120. *J. Appl. Phycol.* Online First.
- Oberhaus, L., Briand, J.F., Leboulanger, C., Jacquet, S. & Humbert, J.F. 2007. Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *J. Phycol.* 43:1191–1199.
- Ou, D. Y., Song, L. R., Gan, N. Q. & Chen, W. 2005. Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poterioochromonas* sp. *Environ. Toxicol.* 20:373–380.
- Pietsch, C., Wiegand, C., Ame, M. V., Nicklisch, A., Wunderlin, D. & Pflugmacher, S. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16:535–542.
- Pflugmacher, S. 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.* 70:169–178.
- Rice, E.L. *Allelopathy*. Academic Press, New York, 1984.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1– 61.
- Sedmak, B. & Kosi, G. 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *J. Plankton Res.* 20:691–708.

- Singh, D. P., Tyagi, M. B., Kumar, A., Thakur, J. K. & Kumar, A. 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17:15–22.
- Sivonen, K.K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In Chorus, I., Bartram, J. [Eds.] *Toxic Cyanobacteria in Water*. Spon, London, pp. 41– 111.
- Suikkanen, S., Fistarol, G.O. & Graneli, E. 2004. Allelopathic effects of the baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308:85–101.
- Vardi, A., Schatz, D., Beerli, K., Motro, U., Sukenik, A., Levine, A. & Kaplan, A. 2002. Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Curr. Biol.* 12:1767–72.
- Yuan, M., Carmichael, W.W. & Hilborn, E.D. 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon.* 48:627-640.

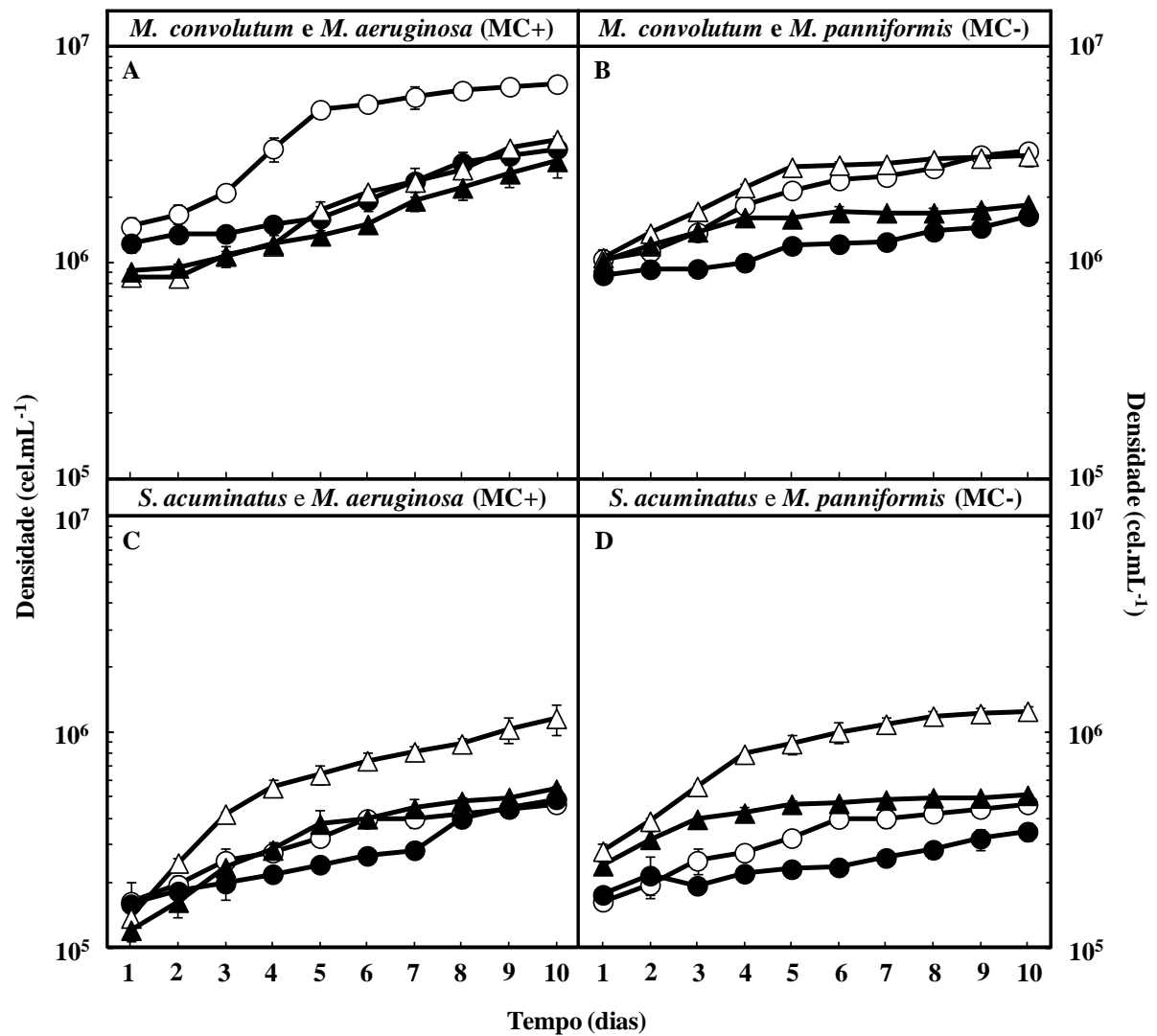


Figura 1. Curvas de crescimento na escala logarítmica (cel.mL⁻¹) ao longo do tempo (dias) nos controles e cultivos mistos entre as cianobactérias e microalgas verdes. **A** – *Monoraphidium convolutum* e *Microcystis aeruginosa* (MC+), **B** – *M. convolutum* e *Microcystis panniformis* (MC-), **C** – *Scenedesmus acuminatus* e *M. aeruginosa* (MC+) e **D** – *S. acuminatus* e *M. panniformis* (MC-). Controle microalga verde (○), microalga verde no cultivo misto (●), controle cianobactéria (△) e cianobactéria no cultivo misto (▲). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC- = linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores apresentados correspondem às médias das três réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

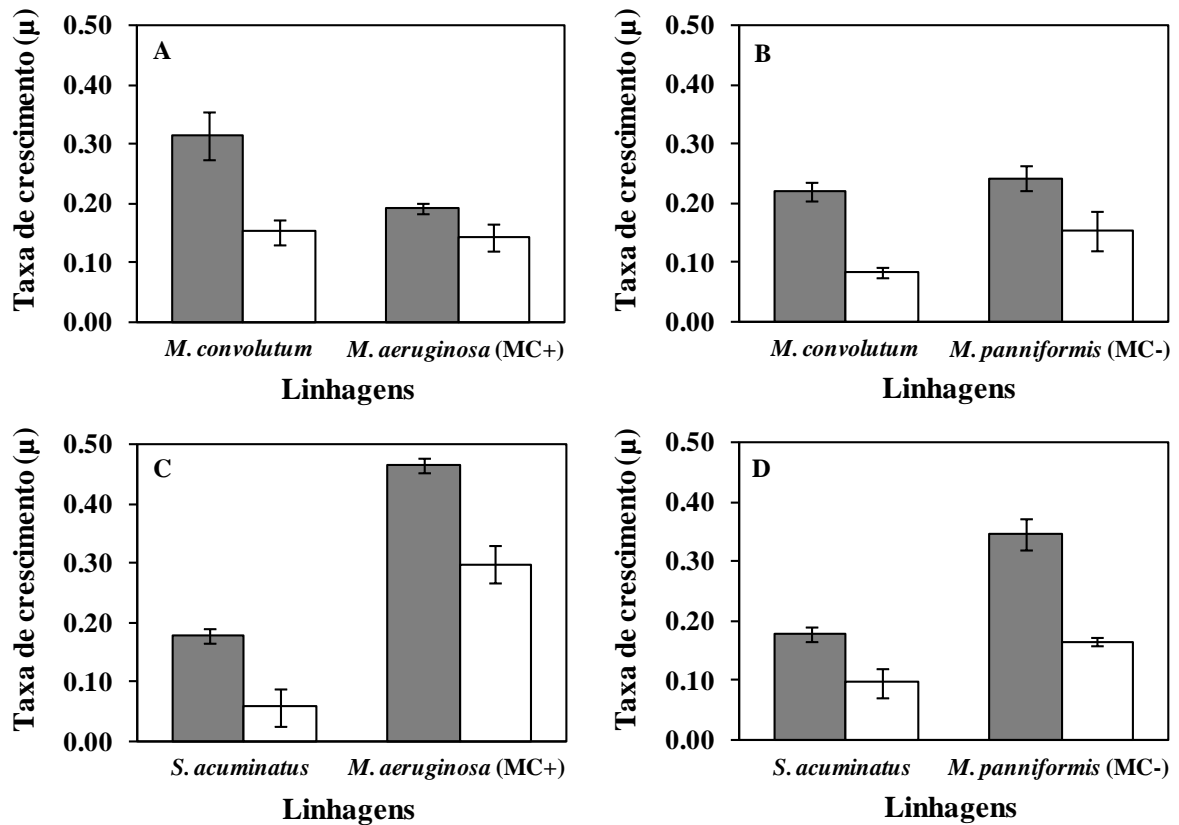


Figura 2. Taxa de crescimento (μ) das cianobactérias e microalgas verdes nos controles (■) e nos cultivos mistos (□) ao longo do tempo. **A** – *Monoraphidium convolutum* e *Microcystis aeruginosa* (MC+), **B** – *M. convolutum* e *Microcystis panniformis* (MC-), **C** – *Scenedesmus acuminatus* e *M. aeruginosa* (MC+) e **D** – *S. acuminatus* e *M. panniformis* (MC-). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC- linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores apresentados correspondem às médias das três réplicas, as barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

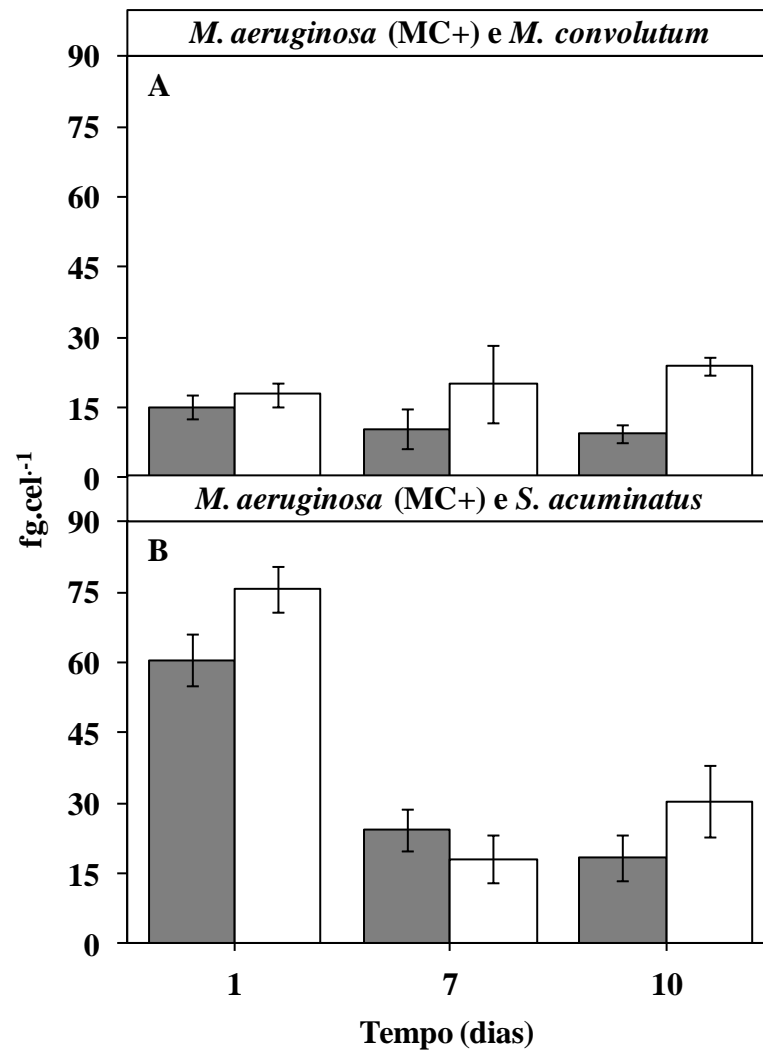


Figura 3. Variação da produção de microcistinas por quota celular (fg.cel⁻¹) por *Microcystis aeruginosa* (MC+) ao longo do tempo no controle (■) e no cultivo misto (□) com *Monoraphidium convolutum* (A) e *Scenedesmus acuminatus* (B). Os valores correspondem às médias das três réplicas e as barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

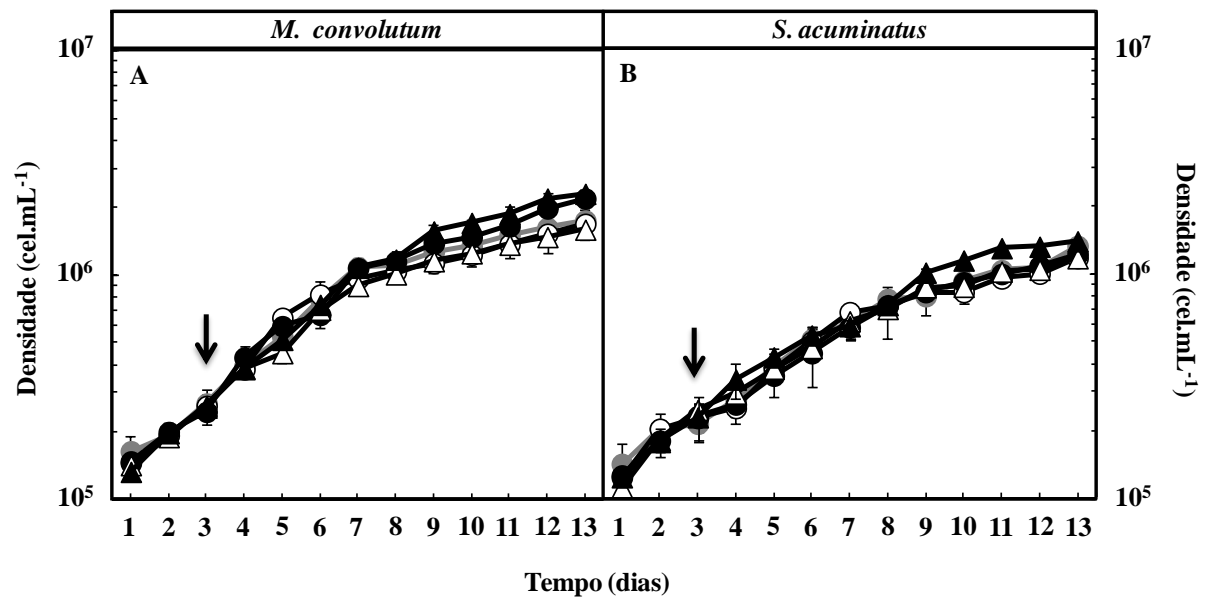


Figura 4. Curvas de crescimento na escala logarítmica (cel.mL^{-1}) ao longo do tempo (dias) de *Monoraphidium convolutum* (A) e *Scenedesmus acuminatus* (B) ao longo do tempo (dias) no controle (\bullet) e nos cultivos com extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* (MC+) correspondentes as concentrações microcistinas de $5\mu\text{g.L}^{-1}$ (\circ) e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ (\blacktriangle) e com adição de extrato de *Microcystis panniformis* (MC-) nas massas correspondentes às utilizadas nos tratamentos $5\mu\text{g.L}^{-1}$ (\triangle) e $10\mu\text{g.L}^{-1}$ (\blacktriangle) da linhagem produtora de microcistinas. A adição dos extratos foi realizada no terceiro dia de experimento, seta indicando (\rightarrow). MC+ = linhagem produtora de microcistinas e MC- = linhagem não-produtora de microcistinas. Os valores correspondem às médias das três réplicas e as barras de erros representam o desvio padrão ($n = 3$).

Tabela 1. Linhagens utilizadas neste estudo. BCCUSP Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo. CMEA/UFF Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar da Universidade Federal de Fluminense. UFSCar Universidade Federal de São Carlos. MC Microcistinas.

Linhagem	Espécie	Toxicidade
Cianobactérias		
BCCUSP200	<i>Microcystis panniformis</i>	MC (-) ^a
BCCUSP232	<i>Microcystis aeruginosa</i>	MC (+) ^a
Chlorococcales		
CMEA/UFF0201	<i>Monoraphidium convolutum</i>	Não
UFSCar036	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Não

^a Bittencourt-Oliveira (2003).

Tabela 2. Linhagens das microalgas verdes, códigos dos tratamentos, extratos das linhagens e concentrações de microcistinas a serem utilizados nos experimentos. Mo *Monoraphidium convolutum* (CMEA/UFF0201). Sc *Scenedesmus acuminatus* (UFSCar036). MC Microcistinas. Mo0 e Sc0 Controle sem a adição de extratos.

Espécie/Código		Extrato da	Concentração
<i>M. convolutum</i>	<i>S. acuminatus</i>	cianobactéria	($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Mo0	Sc0	Ausente	-
Mo+MC-5,0	Sc+MC-5,0	BCCUSP232	5,0
Mo+MC-10,0	Sc+MC-10,0	BCCUSP232	10,0
Mo-MC-5,0	Sc-MC-5,0	BCCUSP200	-
Mo-MC-10,0	Sc-MC-10,0	BCCUSP200	-

ANEXO

NORMAS DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

Submission of manuscripts to the *Journal of Phycology* is through our online manuscript submission and review system, ScholarOne Manuscripts, a ScholarOne product that is provided by Wiley-Blackwell.

To submit your manuscript, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jpy>. The online submission is a step-by-step process; full instructions are provided, and additional support is available online. Authors will be able to track the progress of their manuscripts and will be notified when referee and editor comments are available online. Use of ScholarOne Manuscripts will facilitate the transfer of manuscripts between associate editors and reviewers.

EDITORIAL POLICY The *Journal of Phycology* publishes all aspects of basic and applied research on algae to provide a common medium for the ecologist, physiologist, cell biologist, molecular biologist, morphologist, taxonomist, geneticist, and biochemist, among others. Papers are accepted on the basis of their original and meritorious data and ideas and potential impact on the field. Preliminary notes and progress papers are unacceptable. Manuscripts may be submitted in the form of research articles or research notes. Manuscripts describing new techniques are welcome; they should include data that illustrate the usefulness of the technique. Reviews and minireviews are generally solicited, but interested authors are encouraged to contact the editor. Comments may be submitted that describe methods or equipment, that discuss papers previously published in the *Journal*, or that discuss other topics of interest to our readers. Comments will be reviewed. Manuscripts submitted must not have been published, accepted for publication, or be under consideration elsewhere. Authors should make appropriate depositions of materials to accession services (e.g., culture collections, herbaria, GenBank, etc.) to permit future work by the scientific community.

All manuscripts must be typed in a 12-point font and must be DOUBLE-SPACED THROUGHOUT, including the literature list, tables, table headings, figure legends, and so forth. Times New Roman font is preferred; do not use a *sans serif* font such as Arial, Helvetica, or Geneva. Each page of the manuscript should be numbered, including the title page. It is also suggested that you number the lines of your manuscript to facilitate the review/editing process. Do not justify right margins or use boldface for headings. Type all headings flush left; italicize subheadings. The Abstract and Results should be written in past tense, except in the case of descriptions of new species. For those species specifically studied in the research, Latin names of algal species should have the taxonomic author(s) of the name listed when first used. To find the taxonomic author(s), check the Algaebase Web site (<http://www.algaebase.org>); the accepted form of the author's name should be used by accessing the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>). New taxa must be

established in accordance with the latest International Code of Botanical Nomenclature.

Authors must mail a signed Copyright Agreement Form (CAF) to the editorial office (Journal of Phycology Editorial Office, Department of Biological Sciences, Science Hall 2, Room 129, California State University San Marcos, 333 South Twin Oaks Valley Road, San Marcos, CA 92096-0001, USA) at the time of manuscript submission. (The editorial office must have the original signed hard copy on file for legal purposes.) The CAF can be downloaded from ScholarOne Manuscripts or by contacting the editorial office (jphycol@csusm.edu). Permission to cite another scientist's unpublished work must be verified by e-mail/letter communication by that individual to the editorial office at the time the manuscript is submitted.

Research articles—The following sequence should be used.

1. *Title page*—This page gives the concise title, including class or division (phylum) designation when a genus or species name is included. Do not include taxonomic authors of scientific names in the title. Use full name (including first name for aid in bibliographic work) of the author(s) and complete address with ZIP or postal code. Place a superscripted number one (¹) after the last word of the title to correspond to a footnote that will indicate date of submission and acceptance. Also indicate the author to contact regarding correspondence by a superscripted number two (²); include an e-mail address, phone, and fax number for the corresponding author. Please ensure that the e-mail address is valid, as this will be the address to which article proofs are sent, as well as reader communication after publication of the article. Include a condensed running title of no more than 35 letters and spaces.

2. *Abstract*—This is a concise abstract (no more than 250 words) of the investigation with the objectives, results, and conclusions included. Include scientific names of key organisms (with taxonomic authors for those species studied in the research). New taxa described in the manuscript must be mentioned. Do not repeat information in the title or make reference to the literature. At the end of the Abstract, list 5 to 10 Key index words (arranged alphabetically) for aid in indexing. Include a section of Abbreviations after the Key index words. List the abbreviation, followed by what it means written out in full (e.g., GFP, green fluorescent protein). Common abbreviations (e.g., DNA) do not need to be listed; a list of abbreviations that do not need to be spelled out appears at the end of these instructions. The Abstract, Key index words, and Abbreviations should be in roman type (not italicized), except for scientific names.

3. *Introduction*—This is a brief description of the purpose of the investigation and of pertinent background literature specific to the research project. It should not be a general

review of the field. It should take into consideration those who are not experts in the particular area.

4. *Materials and Methods*—Describe the methodology used in the study in sufficient detail to permit the study to be replicated by another scientist. Whenever possible, give sources of materials in detail. If cultures are used, indicate the strain or clone number and the availability. If study sites are mentioned, provide the latitudes/longitudes. For materials and supplies (including software), indicate the source (company name, city, state, country) on first reference. This manufacturer and location information should be provided for all brand-name products. For example, DAPI (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA). In addition, list the model number for equipment used, as appropriate. Use metric units (*Système International d'Unités*, SI) and SI style.

5. *Results*—Only results of the study should be included here. Rationale for undertaking certain aspects of the investigation, methods, techniques, and so forth, must be excluded. Cite each figure and table in the text in order of presentation (e.g., Fig. 1 before Fig. 2, Table 9 before Table 10). When tables or figures are presented, cite only the significant results in the text. Do not duplicate the presentation of data in both a figure and a table. Tables of specimens studied should be placed in supplementary materials. Photographs should only be included if necessary to illustrate results. Include statistical analyses or other indicators to enable assessment of the variance of replicates of the experiments.

6. *Discussion*—The significant results and their importance to the study and to the discipline in general should be discussed. Reference to illustrative material should be minimal and should be provided only when necessary to emphasize a specific interpretation. Repetition of the Introduction should be minimized. The Results and Discussion may be combined, in which case a Conclusions section might be advantageous.

7. *Acknowledgments*—This section is to be used as necessary to acknowledge an institutional paper number and financial and other assistance.

8. *References*—Citations in the text are in chronological, then alphabetical order (e.g., Scott and Fischer 1992, Mannos et al. 2006, Mowbray 2008). References in the reference list must be arranged alphabetically. Arrange multiple references by the same author(s) chronologically. The author is responsible for verifying the accuracy of unpublished citations. Double-space all references and check them against the originals for accuracy. Type references flush left (i.e., without hanging indents) with an extra space between citations; they will be formatted properly at the press. Journal titles should be abbreviated following the BIOSIS SERIAL SOURCES, which is published each December and is available in most libraries (or go to <http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt>). If in doubt

about any journal abbreviation, include the full title. The style to be used for references is as follows:

Journal articles:

Harrison, W. G. 1973. Nitrate reductase activity during a dinoflagellate bloom. *Limnol. Oceanogr.* 18:457–65.

Mann, H., Mann, S. & Fyfe, W. S. 1987. Aragonite crystals in *Spirogyra* sp. (Chlorophyta). *J. Phycol.* 23:506–9.

Contribution to a book:

Droop, M. R. 1974. Heterotrophy of carbon. In Stewart, W. D. P. & Pierce, C. E. [Eds.] *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 530–59.

Book: Smith, G. M. 1950. *The Fresh-Water Algae of the United States*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 719 pp.

Thesis:

Sanderson, B. L. 1998. Factors regulating water clarity in northern Wisconsin lakes. Ph.D. dissertation, University of Wisconsin, Madison, 227 pp.

Online sources/software:

Verbruggen, H. 2008. *TreeGradients*. Available at: <http://www.phycoweb.net> (last accessed 12 October 2008).

Swofford, D. L. 2003. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

References that pertain only to supplementary materials are not included in the manuscript References section but should be submitted with the supplementary material to which they correspond.

9. *Tables*—Tables should be created using the Table function in Word (rather than using tabs). Place a descriptive title at the top of each table. Start each table on a new page. The title and table contents must be typed double-spaced throughout in 12-point font. Number tables with Arabic numerals (e.g., Table 2). Keep footnotes to a minimum, and use superscripted letters (^a, ^b, ^c) for footnotes rather than symbols or numbers. As vertical lines cannot be typeset, any table requiring such is considered a figure. Complex tables will be set at the author's expense, unless they are submitted as a camera-ready figure that can be treated as a line drawing.

10. *Figures*—For submission of your final manuscript, we must receive your artwork in digital format. Each figure should be submitted as a separate TIFF, PDF, or EPS file created at a resolution of 300 dpi or higher at final size. (Combination images, or images that contain both vector and bitmap graphics, could be supplied at a higher resolution to prevent image quality loss in the bitmap graphics, such as in the symbol keys. The recommended

figure size for combination images is 600 dpi at final size.) Images must be provided as either one column (3¼" or 8.2 cm) or two column (6¾" or 17.5 cm) width and no more than 8 inches (18–20 cm) in height.

A note on resampling: If your image size is less than 300 dpi at final size, you must re-create the figure. You cannot increase the resolution of a lower resolution figure by simply resaving it at 300 dpi—this will not result in a higher-quality image, and the result may be pixilated or grainy images and poor text quality. More details on submitting artwork can be found on the Web site at: http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp.

All terms, abbreviations, and symbols should correspond to those used in the text of the paper. It is preferable to include a symbol key on line drawings. Component figures (panels) within a plate should be labeled with letters, not numbers (e.g., a, b, c, not 1, 2, 3).

a. *Drawings, graphs*—Labeling on line drawings must be large enough to be read easily after reduction; many line drawings are reduced to one-column width. Use the reducing function on a photocopy machine to check that the labeling is of sufficient size. The outer line on bars or boxes should be adequately sized for reduction (at least 1-point font). Italicize names of species in line art. For drawings, place a measured mark (scale line) on the drawing to facilitate determination of magnification. Do not use two shades of grays in histograms. Line art will be reproduced from electronic files. Axis labels should be of uniform font and size and should not be bolded. Use an initial capital letter for the first word of each label (e.g., Relative carbon content). If units are included in the label, use SI style (e.g., $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Numerals should include a comma in the thousands place (e.g., 1,200).

b. *Photographs*—Individual photographs forming a plate should be of equal contrast to facilitate printing. Each photograph must be squared accurately, and a thin white line should be inserted between them. A measured mark for scale determination must be included. Scale length may be indicated directly above the scale or in the legend.

c. *Color*—The charge for color in print is \$700 per figure. Authors who do not have funding for color may apply to the editor for a waiver, which will only be granted should there be a scientific need for color, as established during peer review.

d. *Legends*—Legends must be *typed double-spaced in paragraph form* and placed together on a separate sheet in the manuscript document you submit. Do not repeat details included in the text, but give enough explanation for adequate interpretation. See recent issues of the Journal for format.

11. *Supplementary Tables and Figures*—Wiley-Blackwell is able to host online approved supplementary material that authors submit with their paper. Supplementary material must be important, ancillary information that is relevant to

the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. More information about guidelines for supplementary material can be found at the Web site: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>. Supplementary materials should be submitted as files separate from the main manuscript document. Each supplementary item should be submitted as a separate file. Tables, figures, or data appendices should be numbered S1, S2, etc. (i.e., Table S1, S2, etc.; Figure S1, S2, etc.; Appendix S1, S2, etc.). For supplementary figures, unlike the main manuscript figures, the figure and legend should appear together. The editorial office may suggest that additional figures or tables be moved to supplementary materials (e.g., list of specimens analyzed). References that pertain only to supplementary materials are not included in the main manuscript References section but should be submitted with the supplementary material to which they correspond.

Research notes and reviews—Research notes occupying one to three printed pages are acceptable. Use the same general format as that of research articles, except for the headings, which must be removed (with the exception of the Abstract). Minireviews occupy three to eight printed pages and are in commentary style; use only one set of headings (i.e., no subheadings) and include a brief abstract. Reviews occupy up to 20 printed pages and can include several levels of headings. *Note: estimate three typed pages of text for every printed journal page.*

COVER SUBMISSIONS Particularly good photographs that pertain to a paper being submitted will be considered for use on the cover. Submit the image file(s) at 300 dpi or better resolution, in either TIFF or EPS format, with the final copy of the manuscript—preferably scalable to a 12.7 × 17.8 cm (5 × 7 inch) format. Include a brief legend for the inside front cover (sent as a separate Word document).

REVIEW OF MANUSCRIPTS AND SUBMISSION OF REVISED MANUSCRIPTS Every article submitted is reviewed by the editor and an associate editor for scientific merit and potential impact on the field, plus conformity to the editorial policy and to the style of the Journal. Papers meeting these requirements are then anonymously peer-reviewed by at least two referees and an associate editor, the editor, or a member of the editorial board. The decision regarding acceptance or rejection of a manuscript is the responsibility of the associate editors and the editor, with the editor assuming final responsibility. The associate editor will usually correspond with the designated author during the review process. It is the corresponding author's responsibility to communicate to the other authors any changes made to the manuscript in revision and to ensure that all authors are aware of the contents of the paper. A manuscript that has been rejected may be resubmitted in six months only if the author(s) are able to present new data that address the concerns of the reviewers. Manuscripts returned to authors for revision following review must be resubmitted within six months of the date the revision was requested. Most manuscripts are published within four months of

acceptance. Please go to ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jpy>) for instructions on submitting your revised paper online (only papers that were originally submitted online may be submitted online as revised manuscripts).

AUTHOR SERVICES Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article—once it has been accepted—through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. It is important to ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/default.asp> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission, and more.

OPEN ACCESS Wiley-Blackwell provides an open access option called OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

PROOFS AND OFFPRINTS Instructions for electronically downloading page proofs will be sent to the corresponding author directly by Wiley-Blackwell, along with supporting documents, including instructions for reviewing your proofs, a page and color charge form, and information about ordering hard copy offprints. Please note: If you wish to order hardcopy offprints, you must place an order before the article has gone to press. Hardcopy offprints are only available for purchase prepublication of an article. The page proof corrections must be returned to the editorial office immediately (within 48 hours, excluding weekends and holidays), and the page charge form should be returned to the publisher (as indicated on the form).

PDF OFFPRINTS Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.

Terms of use—Authors who receive a postpublication PDF offprint from the Psychological Society of America may distribute the file for personal or professional use; however, the file may not be posted to the author's Web site for uncontrolled downloading until six months have elapsed since publication. Offprints shall include the complete citation information.

PAGE CHARGES To pay some of the costs of publishing the *Journal of Psychology*, the Journal assesses page charges for each paper published, except solicited reviews. Payment of page charges is not a condition for the acceptance of a manuscript for publication. Papers in which a PSA member is the first author or corresponding author are exempt from black-and-white page charges. Visit the PSA Web site at <http://www.psaalga.org> for membership information. Nonmember author(s) will be assessed page charges for each paper accepted for publication. Rates (2010) are \$50 per printed page for black-and-white pages, and \$700 per color page.

EARLYVIEW The *Journal of Psychology* is covered by Wiley-Blackwell's EarlyView service. EarlyView articles are complete, full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. EarlyView articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised, and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of EarlyView articles means that they do not yet have volume, issue, or page numbers, so EarlyView articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Manuscripts in an issue will be published at <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118502413/home>. Abstracts are accessible online to the public; individual members and subscribing libraries can view the full contents of the Journal through a password system. See subscription information at <http://www.jpsychol.org/join.asp> for details.

COPYRIGHT PERMISSION Please contact the editor for permission to reproduce any portion of an article that has been published in the Journal. Copyright is held by the Psychological Society of America.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened against previously published works.