



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**ALANE SILVA DE AQUINO DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA) PRODUTORA DE  
MICROCISTINAS EM CLADÓCEROS TROPICAIS: INVESTIGAÇÃO SOB  
DIFERENTES VIAS DE EXPOSIÇÃO**

**RECIFE**  
**Junho de 2017**

**ALANE SILVA DE AQUINO DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA) PRODUTORA DE  
MICROCISTINAS EM CLADÓCEROS TROPICAIS: INVESTIGAÇÃO SOB  
DIFERENTES VIAS DE EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGE/UFRPE), como  
requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

**Linha de Pesquisa:** Ecologia de Ecossistemas Aquáticos.

**Orientadora:** Dra. Ariadne do Nascimento Moura (DB/UFRPE).

**Coorientador:** Dr. Renato José Reis Molica (UAG/UFRPE)

**RECIFE**

**Julho de 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237t Santos, Alane Silva de Aquino dos  
Toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria)  
produtora de microcistinas em cladóceros tropicais: investigação  
sob diferentes vias de exposição / Alane Silva de Aquino dos  
Santos. – 2017.  
66 f. : il.

Orientadora: Ariadne do Nascimento Moura.

Coorientador: Renato José Reis Molica.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Recife,  
BR-PE, 2017.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Cladóceros 2. Toxicidade 3. Microcistinas I. Moura, Ariadne  
do Nascimento, orient. II. Molica, Renato José Reis, coorient.  
III. Título

CDD 574.5

**ALANE SILVA DE AQUINO DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA) PRODUTORA DE  
MICROCISTINAS EM CLADÓCEROS TROPICAIS: INVESTIGAÇÃO SOB  
DIFERENTES VIAS DE EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGE/UFRPE), como requisito obrigatório para a obtenção do título de mestre em Ecologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Ariadne do Nascimento Moura (DB/UFRPE)

Presidenta da banca e orientadora

---

Profª. Dr. Aloysio da Silva Ferrão Filho (FIOCRUZ/RJ)

---

Profª. Dr. Mauro de Melo Júnior (DB/UFRPE)

---

Profª. Dra. Paula Braga Gomes (DB/UFRPE)

---

Profª. Dra. Ana Carla Asfora El-Deir – (DB/UFRPE)

Membro Suplente

**RECIFE**

**Julho de 2017**

*Dedico esta dissertação:*

*A minha mãe Anacleia Chaves, por ter acreditado no meu potencial sempre, a você todo meu amor.*

*A mãezinha e paizinho (Fransquinha Gomes e Manoel Rodrigues) pelas experiências compartilhadas, eu aprendi.*

*A minha irmã Andressa Rochelle (Dêssa) pela cumplicidade e amizade eterna.*

*Aqueles que são esperança e me estimulam a correr atrás do futuro, Francivane Carvalho (Anny), Aryadne Clear Chaves e Arthur Ben Chaves.*

*Ao meu amado e amigo, Carlos Renato dos Santos, por todo companheirismo e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me fazer forte e sempre ter me guiado em todos os momentos de decisões durante essa jornada.

A todos da minha família que amo tanto, mãe, irmãos, sobrinhos, tios, tias, primos e primas por todo carinho.

A minha sogra Maria Aparecida Pereira e Francisco Pereira (tio Chico) por todo apoio durante estes anos.

Aos meus orientadores Prof<sup>a</sup>. Ariadne Moura, Prof<sup>o</sup>. Renato Molica e Mauro Vilar, por todo ensinamento compartilhado, pela paciência e boa vontade de orientar, durante todo o processo de escrita desse trabalho. Minha eterna admiração.

Aos colegas do Laboratório de Ficologia, em especial Cihélio Amorim, por ter me ajudado nas coletas e isolamento dos cladóceros e em tudo que precisei. Obrigada, por ser um amigo incrível e dedicado.

Ao Laboratório de Biotecnologia-Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE, pelo apoio logístico para realização de todos os experimentos deste trabalho.

Agradeço a ajuda e a amizade da doutoranda Alana Emília por todas as vezes que precisei usar equipamentos no Laboratório de Biotecnologia e aos meus parceiros diários de laboratório e de casa, Argemiro Martins, Marcele Moraes e Wellington Leal por tornarem meus dias de trabalho mais divertidos.

A todos meus professores da pós-graduação de Ecologia que contribuíram na minha formação.

Aos avaliadores desta dissertação, professores Aloysio Ferrão Filho, Mauro de Melo, Paula Gomes e Ana Carla El-Deir por terem aceitado o convite e pelas valiosas considerações para este trabalho.

Sinto-me muito feliz por este momento e muita gratidão por todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para conclusão desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1 Cianobactérias e cianotoxinas.....	3
2.2 Ecologia de <i>Microcystis</i> .....	4
2.2.1. Microcistinas e outros peptídeos.....	5
2.3 Vias de exposição.....	6
2.4. Toxicidade de microcistinas no zooplâncton.....	7
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	9
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	9
4.1 Geral.....	9
4.2 Específicos.....	9
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	10
<b>6. CAPÍTULO 1: Artigo a ser submetido à <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> – A toxicidade das microcistinas em cladóceros varia em função da via de exposição?</b> .....	20
6.1 Resumo.....	22
6.2. Introdução.....	23
6.3. Materiais e Métodos.....	24
6.3.1 Manutenção dos cladóceros.....	24
6.3.2 Cultivo das linhagens de cianobactéria e algas verde.....	25
6.3.3. Estimativa da biomassa em carbono nas culturas de cianobactéria e alga verde.....	25
6.3.4. Obtenção de biomassa e preparação do extrato bruto de <i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i> .....	25
6.3.4. Extração e análises de microcistinas (HPLC-PDA).....	26
6.3.5. Desenho experimental.....	27
6.3.5.1. Ensaio de toxicidade aguda.....	27
6.3.5.2. Ensaio de toxicidade crônica.....	27
6.3.6. Análises estatísticas.....	29
6.4. Resultados.....	29
6.4.1. Ensaio de toxicidade aguda.....	29
6.4.2. Ensaio de toxicidade crônica.....	30
6.5. Discussão.....	32
6.5.1. Ensaio de toxicidade aguda.....	32
6.5.1. Ensaio de toxicidade crônica.....	33
6.6. Conclusão.....	35
6.7. Referências.....	37
<b>APÊNDICE 1</b> Cromatograma (A) e espectro de UV do padrão da microcistina-LR (B)....	54
<b>APÊNDICE 2</b> Cromatograma e espectros de UV da amostra de <i>M. aeruginosa</i> NPLJ4 ...	55
<b>ANEXO 1</b> Normas para publicação na <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> .....	56

## RESUMO

As cianobactérias podem produzir vários metabólitos tóxicos como alcaloides e peptídeos bioativos. Dentre estes, as microcistinas são os mais reportados, podendo interferir na qualidade do corpo d'água, causando danos ecológicos tais como alterações na cadeia trófica, declínio da biodiversidade local, bem como impactos na saúde pública. As microcistinas podem estar retidas dentro da célula ou serem liberadas através de lise celular em fase de senescência da floração no ambiente aquático, onde os animais são expostos a essas duas vias de exposição no ambiente. Diante disso, foi estimada a toxicidade de células intactas e extrato bruto aquoso de células da linhagem *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 produtora de microcistina-LR, sobre cladóceros. Foram avaliados os efeitos sobre a mortalidade, idade da primeira reprodução, fecundidade média, total de neonatos, sobrevivência, crescimento somático e populacional de *Ceriodaphnia cornuta* e *Macrothrix spinosa*. Os animais foram mais sensíveis a células intactas. As duas vias de exposição afetaram os parâmetros populacionais dos cladóceros, porém as células intactas foram mais tóxicas. A taxa de crescimento somático dos animais não foi afetada pelo extrato bruto, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos e controle. Esses resultados mostram que a ingestão de células intactas é mais tóxica para os cladóceros que a exposição às toxinas liberadas na água. Com este estudo, espera-se contribuir para o conhecimento das interações entre o zooplâncton e as cianobactérias tóxicas, sobretudo sob eventos de florações.

**Palavras-chave:** cianotoxinas, efeito agudo, efeito crônico.



## ABSTRACT

Cyanobacteria can produce various toxic metabolites such as bioactive alkaloids and peptides. Among these, the microcystins are the most reported, and may interfere with the quality of the water body, causing ecological damages such as changes in the food chain, local biodiversity decline, and impacts on public health. Microcystins may be retained within the cell or be released by cell lysis in the senescence phase of flowering in the aquatic environment where the animals are exposed to these two routes of exposure in the environment. Therefore, the toxicity of intact cells and crude aqueous extract of microcystin-LR-producing cells *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 on cladocerans was estimated. The effects on mortality, age of first reproduction, mean fecundity, total neonates, survival, somatic and population growth of *Ceriodaphnia cornuta* and *Macrothrix spinosa* were evaluated. The animals were more sensitive to intact cells. The two routes of exposure affected the population parameters of cladocerans, but the intact cells were more toxic. The somatic growth rate of the animals was not affected by the crude extract, and there were no significant differences between treatments and control. These results show that intake of intact cells is more toxic to cladocerans than exposure to toxins released into the water. With this study, it is hoped to contribute to the knowledge of the interactions between zooplankton and toxic cyanobacteria, especially under blooming events.

Key words: cyanotoxins, acute effect, chronic effect.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As florações de cianobactérias em águas superficiais vêm aumentando em todo mundo, e estão relacionadas com a eutrofização artificial e alterações climáticas (BURATTI *et al.* 2017). Suas elevadas biomassas apresentam risco à saúde humana e para a sustentabilidade do ecossistema e algumas espécies desse grupo são potencialmente produtoras de cianotoxinas (HUDNELL e DORTCH, 2008).

As cianotoxinas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e hepatotoxinas (DITTMANN *et al.* 2013). Dentre estas, as hepatotoxinas são as mais estudadas, sendo caracterizadas como peptídeos cíclicos inibidores de proteínas fosfatase 1 e 2A. Entre as hepatotoxinas, destacam-se as microcistinas pela sua grande ocorrência em todo mundo (MOLICA E AZEVEDO, 2009) e por serem produzidos pela maioria dos gêneros de cianobactérias formadoras de florações (DITTMANN *et al.* 2013). Existem mais de 100 congêneres de microcistinas e a variação de aminoácidos, principalmente nas posições 2 e 4 em radicais e/ou cadeias L-laterais específicos e as demetilações nas posições 3 e 7 são os fatores responsáveis pelo grande número de análogos, sendo a microcistina-LR (leucina-arginina) o congênere de maior toxicidade ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; ex.;  $\text{DL}_{50}$  em camundongo) (BOUHADDADA *et al.* 2016).

A maioria dos estudos toxicológicos focam nas microcistinas e os efeitos tóxicos do congênere microcistina-LR, que já demonstrou efeitos tóxicos a nível hepático, renal e reprodutivo em animais, após exposição a este análogo (EPA, 2015), sobretudo organismos aquáticos (HUANG *et al.* 2015; CHEN *et al.* 2016), principalmente no zooplâncton (CERBIN *et al.* 2010).

O zooplâncton que se alimenta de forma generalista, não tendo a capacidade de selecionar o alimento, pode acabar ingerindo cianobactérias produtoras de toxinas, resultando em distúrbios nas relações tróficas, em ecossistemas aquáticos afetados por florações de cianobactérias (BOWNIK, 2016). Este grupo de animais, mais especificadamente os cladóceros, desempenha um papel importante no controle *top-down* do fitoplâncton, mostrando interação direta com o mesmo (COSTA *et al.* 2013; FERRÃO-FILHO *et al.* 2014; HERRERA *et al.* 2015).

Os cladóceros são componentes importantes e abundantes em ecossistemas aquáticos, apresentam uma diversificação morfológica, riqueza com mais de 700 espécies e uma importância na cadeia alimentar aquática global, ligando o fitoplâncton aos níveis tróficos mais elevados (DAMME e KOTOV, 2016). Estes microcrustáceos são utilizados para avaliar a

qualidade ambiental e são especialmente comuns em testes de ecotoxicologia (FREITAS e ROCHA, 2011) por apresentarem ciclo de vida curto e reprodução por partenogênese. Esta última apresenta vantagens, em relação ao controle da variação genética, permitindo testar efeitos transgeracionais maternos e, por fim, populações multi-clonais não apresentam fluxogênico constante, o que ajuda a entender as relações entre genótipos e fenótipos diante dos efeitos tóxicos (SUHETT *et al.* 2015).

Em relação aos efeitos tóxicos de microcistinas sobre cladóceros, estes podem ser agudos e crônicos (FERRÃO-FILHO, 2009) e dependem, principalmente, do tipo de exposição (FERRÃO-FILHO & AZEVEDO, 2003; ABREU & FERRÃO-FILHO, 2013; FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011), no geral esses animais, no ambiente aquático, podem estar expostos às toxinas extracelulares (dissolvidas no meio), que podem aumentar durante a senescência da floração, e às intracelulares (através da ingestão de células), que aumentam com o desenvolvimento da floração (KOREIVIENĖ *et al.*, 2013).

Diante do exposto, faz-se necessário conhecer as reações dos cladóceros no início e final das florações, através da toxicidade de células intactas e extrato bruto de cianobactéria, o que contribui para o conhecimento da sensibilidade desses animais, sob essas vias de exposição. Além disso, espera-se contribuir para o conhecimento do papel dos cladóceros tropicais nos ecossistemas aquáticos, uma vez que a maioria dos estudos de toxicidade são utilizados espécies de ambientes temperados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1-Cianobactérias e cianotoxinas

A longa história evolutiva (3,5 bilhões de anos) das cianobactérias permitiu sua diversificação estrutural e funcional (PAERL, 2014), fazendo com que persistissem durante as numerosas mudanças geoquímicas e climáticas pelas quais o planeta Terra vem passando. A sensibilidade, flexibilidade ecofisiológica e adaptação das cianobactérias, são produtos de sua evolução, podendo ser encontradas em habitats como fontes termais, lagos hipersalinos e desertos (WEHR e SHEATH, 2003; PAERL e HUISMAN, 2009; CHATZIEFTHIMIOU *et al.* 2014 e 2016).

As cianobactérias evoluíram com diferenciações celulares tais como heterócitos, que são células especializadas na fixação do N<sub>2</sub> atmosférico, presentes apenas em algumas espécies, e acinetos, que são esporos de resistência, capazes de suportar estresse ambiental e ainda armazenam fósforo. Além disso, apresentam aerótopos (vacúolos de gás), que controlam sua posição na coluna d'água. Essas características lhes proporcionam grandes vantagens em relação a outros grupos do fitoplâncton permitindo sua ampla distribuição e ocupação de diferentes nichos (SANT'ANNA *et al.* 2006; CALIJURI *et al.* 2006).

Estes microrganismos ainda podem formar florações, que é o crescimento massivo de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003). Esses eventos têm sido relacionados com as alterações ambientais causadas pelo clima, fatores antropogênicos (aumento da poluição orgânica disponibilizando nutrientes como nitrogênio e fósforo), mudanças hidrológicas e alterações biológicas (interações tróficas com zooplâncton e peixes) que podem afetar a composição da comunidade fitoplanctônica, influenciando na dominância e persistência das cianobactérias nos ambientes aquáticos (PAERL, 2014).

A elevada biomassa de cianobactérias acarreta grandes danos ecológicos, tais como perda da diversidade de espécies, trazendo alterações ao longo da cadeia trófica, além de interferir na qualidade e no uso da água, principalmente quando a utilização é para abastecimento público, trazendo risco à saúde humana (BITTENCOURT-OLIVEIRA e MOLICA, 2003; PAERL, 2008; FERNANDES *et al.* 2009).

O mais preocupante nas cianobactérias é que algumas espécies são produtoras de toxinas (APELDOORN *et al.* 2007), as quais são classificadas quanto à sua atividade biológica em hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (s), saxtoxinas), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lingbiatoxina, aplisiatoxina e lipopolissacarídeos de parede celular) (DITMANN *et al.* 2013) e são quimicamente

caracterizadas como peptídeos cíclicos (microcistina e nodularinas) e alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a (s), saxitoxinas, cilindrospermopsina, aplisiatoxinas e lingbiatoxina) (APELDOORN *et al.* 2007).

As cianotoxinas mais estudadas são as hepatotoxinas, potentes inibidoras das proteínas fosfatases 1 e 2A, podendo causar morte em um curto intervalo de tempo (NAMIKOSHI *et al.* 2003). Dentre estas, destacam-se as microcistinas que são as mais estudadas, em razão da sua grande ocorrência em todo mundo (MOLICA e AZEVEDO, 2009) e por serem produzidas pela maioria dos gêneros de cianobactérias formadoras de florações, dentre estes estão espécies de *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Sphaerospermopsis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Fischerella*, *Gloeotrichia* e *Hapalosiphon* (EPA,2015; DITTMANN *et al.* 2013).

A toxicidade de microcistina já foi descrita em diversos organismos como mamíferos, causando choque hemorrágico ou falência hepática e formando tumores em exposições a baixas concentrações (ZEGURA *et al.* 2011); macrófitas aquáticas, reduzindo a germinação e crescimento dessas plantas (ROJO *et al.* 2013; ROMERO-OLIVA *et al.* 2014); zooplâncton, afetando negativamente a sobrevivência, reprodução e crescimento desses animais (CHEN *et al.* 2013; SMUTNÁ *et al.* 2014; HERRERA *et al.* 2015); peixes, causando danos celulares ao fígado e alterações das funções hepáticas (CHEN *et al.* 2016; QIAO *et al.* 2016) e em humanos, causando distúrbios visuais, náuseas, fraqueza muscular e insuficiência hepática aguda, levando a morte (AZEVEDO *et al.* 2002).

Apesar de existirem trabalhos relatando os efeitos adversos das cianotoxinas, a função das mesmas ainda é pouco compreendida. Holland e Kinnear (2013) acreditam que a evolução da produção dessas toxinas é dependente de inúmeros fatores ambientais (bióticos e abióticos) e sustentam duas vertentes para explicar o papel ecológico das mesmas: a primeira, que as toxinas são produzidas contra predação ou para atuar como um composto alelopático e a segunda que as mesmas evoluíram para auxiliar a função fisiológica geral. Além disso, Utkilen e Gjølme (1995), discutem o papel das mesmas como quelantes de metais pesados e Dittmann *et al.* (2001) sugerem a possibilidade de exercerem papel na comunicação intercelular (*quorum sensing*). Com isso, é relevante mais estudos relacionados a produção de cianotoxinas e seus efeitos sobre as comunidades aquáticas.

## **2.2-Ecologia de *Microcystis***

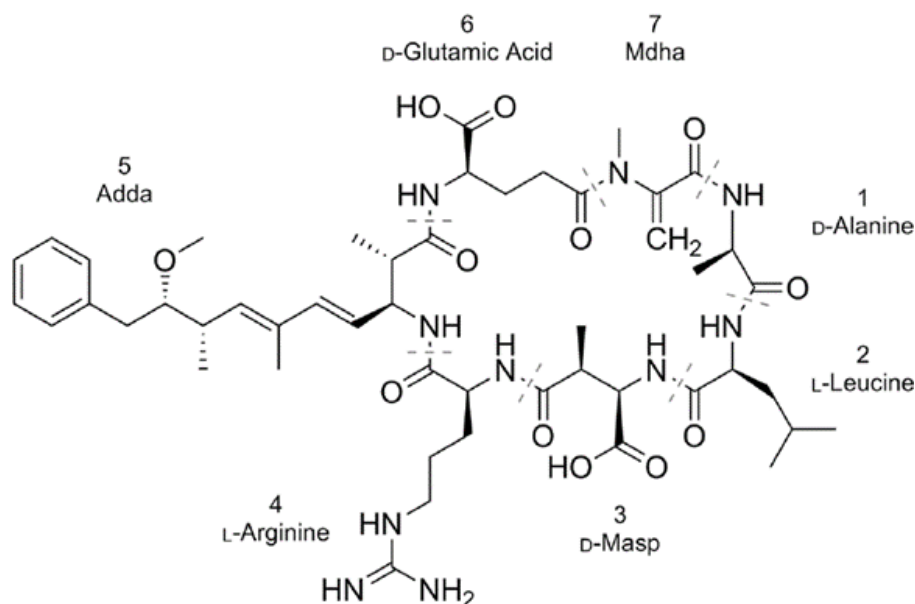
Cianobactérias do gênero *Microcystis* Kützing ex Lemmermann formam florações superficiais que podem ser tóxicas (PAERL *et al.* 1983; CODD, 2000). Este gênero está

presente em ecossistemas aquáticos de todo o mundo (BURATTI *et al.* 2017), apresentando tolerância a elevadas temperaturas (acima de 25 °C) e irradiação de luz, devido ao aumento da produção de carotenoides e pigmentos fotoprotetores, o que otimiza a eficiência fotossintética desse gênero, proporcionando sua persistência na superfície da água. Florações desse gênero comumente formam uma camada superficial que promove o sombreamento da coluna d'água, interferindo no desenvolvimento (PAERL *et al.* 1983), diversidade e riqueza de outras espécies fitoplanctônicas (TUCCI e SANT'ANNA, 2003), contribuindo assim para sua dominância nos ambientes aquáticos.

Há relatos da ocorrência de várias espécies desse gênero em ecossistemas aquáticos brasileiros: *Microcystis aeruginosa*, *M. botrys*, *M. panniformis*, *M. wesenbergii*, *M. protocystis* e *M. novacekii* (SANT'ANNA *et al.* 2004; COSTA *et al.* 2006; CARVALHO, 2008). Dentre estes táxons, destaca-se a *Microcystis aeruginosa*, por apresentar dominância e co-dominância em corpos d'água do mundo (CHELLAPPA *et al.* 2008; DANTAS *et al.* 2008; YUNES, 2009; ANDRADE *et al.* 2009; BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.* 2010; MOHAMED *et al.* 2015; LAGO *et al.* 2015; CHIA e KWAGHE, 2015; BOUHADDADA *et al.* 2016).

### 2.2.1- Microcistinas e outros peptídeos

Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos de síntese não-ribossomal, que apresentam 5 D-aminoácidos e 2 L-aminoácidos em sua estrutura geral (SOARES, 2009) e as diferenças na codificação das enzimas polipeptídeo sintetase e peptídeo sintetase não-ribossomal, responsáveis pela produção das mesmas, é a razão da existência de mais de 100 variantes (PUDDICK *et al.* 2014 e 2015). A microcistina-LR (**Figura 1**), que apresenta os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições 2 e 4 em sua molécula, é uma das variantes mais tóxica (ISAACS *et al.* 2014; GUPTA *et al.* 2003) e frequentemente encontrada nos ecossistemas aquáticos (MOHAMED *et al.* 2015; LAGO *et al.* 2015).



**FIGURA 1:** Estrutura da molécula de microcistina-LR, com leucina e arginina nas posições 2 e 4, respectivamente (PUDDICK *et al.* 2014).

Alguns trabalhos têm evidenciado efeitos adversos em cladóceros causados por linhagens de cianobactérias não produtoras de cianotoxinas (SEMYALO *et al.* 2009; COSTA *et al.* 2013; SADLER e ELERT, 2014b) porque além das cianotoxinas, as cianobactérias são capazes de produzir outros peptídeos bioativos (ciano-peptídeos) os quais também são de origem não-ribossomal sendo quimicamente classificados em peptídeos cíclicos e lineares (WELKER e VON DOHREN, 2006; TAN, 2007).

Trabalhos têm mostrado que espécies de *Microcystis* são capazes de biosintetizar esses metabólitos, dentre eles: aeruginosinas, ciano-peptolinas, microgininas, micropeptinas, microciclâmida, anabaeno-peptinas, que são capazes de inibir proteases, como, carboxipeptidase e serinoproteases (tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina, elastase) (SILVA-STENICO *et al.* 2012; CARNEIRO *et al.* 2012; VEGMAN e CARMELI, 2013; BLADT *et al.* 2014; ISAACS *et al.* 2014). A função dos peptídeos na fisiologia e na ecologia de cianobactérias tem sido discutida e principalmente relacionada à proteção contra predação e alelopatia (WELKER e VON DOHREN, 2006; TAN, 2007; SADLER e ELERT, 2014b). Assim, além da realização de ensaios toxicológicos com microcistinas, é importante realizar com ciano-peptídeos, para determinar os seus efeitos em animais, incluindo humanos (ISAACS *et al.* 2014).

### 2.3-Vias de exposição

As cianotoxinas estão presentes nos ambientes aquáticos de duas formas: dentro da célula (toxinas intracelulares) ou livres na água (toxinas extracelulares) e as concentrações das

mesmas variam à medida que a densidade populacional das cianobactérias aumenta e diminui, ou seja, a concentração de toxinas intracelulares geralmente têm uma distribuição espacial semelhante à das cianobactérias e as concentrações de toxinas dissolvidas permanecem baixas até o envelhecimento natural da floração ou pela lise celular após práticas de manejos, por exemplo, aplicação de algicidas ou ainda podem ser liberadas ativamente pela cianobactéria (GRAHAM *et al.* 2008).

Desta forma, nos ecossistemas aquáticos, as variantes de microcistinas, são encontradas intracelularmente em aproximadamente 95% do tempo durante a floração e tendem a permanecer contidas na célula (intracelular), até que haja lise celular no final desse evento e a microcistina seja liberada para a água (extracelular) (EPA, 2014 e 2015). Isso implica que durante o estabelecimento da floração, as cianotoxinas estão concentradas em maior quantidade no interior da célula e que animais ao ingerir as mesmas, podem ser expostos a uma dose significativamente maior de microcistina (BURATTI *et al.* 2017). Portanto, a exposição as microcistinas intracelulares, através da ingestão de células, tem sido considerada a via de exposição de maior preocupação (VESTERKVIST *et al.* 2012).

Diante disso, faz-se necessário conhecer as reações dos cladóceros no início e fim das florações, através da toxicidade de células intactas e extrato bruto de cianobactéria, o que contribui para o conhecimento da sensibilidade desses animais, sob essas vias de exposição.

#### **2.4-Toxicidade de microcistinas no zooplâncton**

A toxicidade de cianobactérias sobre o zooplâncton vem sendo estudada em todo o mundo pelo fato desses animais apresentarem uma forte interação com as cianobactérias, responsáveis pela transferência de energia para níveis tróficos superiores na cadeia trófica aquática (FERRÃO-FILHO *et al.* 2002).

Já foram descritos efeitos tóxicos de microcistinas em espécies de copépodes (GER *et al.* 2009 e 2010), rotíferos (GENG e XIE, 2008), sendo o grupo de cladóceros o mais utilizado em bioensaios de toxicidade por serem filtradores generalistas (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001), por apresentarem ciclo de vida curto possibilitando a realização de testes a curto prazo, no caso de ensaios agudos, e testes abrangendo o ciclo de vida desses animais, em ensaios crônicos, e por apresentarem reprodução por partenogênese, que assegura clones idênticos sem variação genética, além de originarem uma população numerosa, o que facilita ensaios com muitos animais (SUHETT *et al.* 2015).

Desta forma, a maioria dos estudos de toxicidade, realizados em florações naturais e em cepas isoladas de cianobactérias, focou nos efeitos tóxicos das microcistinas em cladóceros



(SMUTNÁ *et al.* 2014; FERRÃO-FILHO *et al.* 2014b; FREITAS *et al.* 2014; FERRÃO-FILHO *et al.* 2014c). Muitos autores enfatizaram ainda os efeitos do análogo microcistina-LR sobre esses animais (DAO *et al.* 2010; SADLER e ELERT, 2014a; HERRERA *et al.* 2014 e 2015), tendo sido observados a inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A, e alterações histológicas no trato digestivo e bioquímicas na atividade de outras enzimas (proteases, glutatona e estimulação lactato-dehidrogenase) de dafinídeos quando expostos a esta variante (DEMOTT & DHAWALE, 1995; AGRAWAL *et al.* 2001 e 2005; CHEN *et al.* 2005; ROHRLACK *et al.* 2005; SCHWARZENBERGER *et al.* 2010).

Os efeitos podem ser agudos, causando a morte desses animais, ou crônicos, reduzindo a fecundidade e o crescimento dos mesmos (FERRÃO-FILHO, 2009). Segundo Soares (2009), os bioensaios agudos são os mais estudados, entretanto as intoxicações crônicas em níveis subletais provavelmente são mais corriqueiras nos ambientes aquáticos, necessitando aprofundamento de estudos sobre estas. Sobre esses efeitos, Ferrão-Filho *et al.* (2014a) e Ferrão-Filho *et al.* (2000) afirmam que as reações às cianotoxinas dependem da espécie de cladóceros, da toxina produzida e da concentração da mesma, sendo que o tipo de exposição é o fator que mais influencia na toxicidade de cianobactérias (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

Espécies dos gêneros *Daphnia*, *Ceriodaphnia* e *Moina* têm sido comumente usadas nesses ensaios no Brasil (ABREU e FERRÃO-FILHO, 2013; COSTA *et al.* 2013; FERRÃO-FILHO *et al.* 2014a; RESTANI e FONSECA, 2014; VILAR, *et al.* 2014; HERRERA *et al.* 2015). Porém, as espécies de *Daphnia* de ambientes temperados são as mais estudadas, fazendo-se necessário mais estudos com espécies nativas que representem os ecossistemas aquáticos tropicais (FERRÃO-FILHO *et al.* 2002).

Diante do exposto, este estudo foi realizado com intuito de contribuir para o conhecimento da toxicidade de *Microcystis* produtora de microcistina em duas vias de exposição (células intactas e extrato bruto), bem como, contribuir para o entendimento do papel dos cladóceros tropicais nos ecossistemas aquáticos, onde as florações são mais duradouras e estes animais estão expostos por mais tempo a esses eventos.

### 3. HIPÓTESE

Cladóceros tropicais apresentam maior sensibilidade às microcistinas quando submetidos à exposição através da ingestão de células intactas.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1- Geral

Determinar os efeitos adversos de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 produtora de microcistinas em diferentes vias de exposição sob cladóceros tropicais.

#### 4.2- Específicos

- ✓ Verificar a toxicidade aguda de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas em diferentes vias de exposição sobre *Macrothrix spinosa* e *Ceriodaphnia cornuta* .
  
- ✓ Avaliar os efeitos crônicos de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas em diferentes vias de exposição sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Macrothrix spinosa* e *Ceriodaphnia cornuta*.
  
- ✓ Estimar a CL<sub>50</sub> (Concentração Letal Média), LOAEL (Lowest observed adverse effect level) em cladóceros tropicais expostos à *M. aeruginosa* produtora de microcistina, em diferentes vias de exposição.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. Q.; FERRÃO-FILHO, A.S. Effects of an Anatoxin-a(s)-Producing Strain of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) on the Survivorship and Somatic Growth of Two *Daphnia similis* Clones. **Journal of Environmental Protection**, 4, 12-18, 2013.
- ANDRADE, C.M.; GOMES, C.T.S.; ARAGÃO, N.K.C.V.; SILVA, E.M.; LIRA, G.A.S.T. Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobacteria no reservatório de Tapacurá- PE. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, p. 109-117, 2009.
- AGRAWAL, M.K.; BAGCHI, D.; BAGCHI, S.N. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India. **Hydrobiologia**, 464: 37-44, 2001.
- AGRAWAL, M.K.; ZITT, A.; BAGCHI, D.; WECKERSSER, J.; BAGCHI, S.N.; VONELERT, E. Characterization of proteases in guts of *Daphnia magna* and their inhibition by *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Environmental Toxicology**, 20: 314-322, 2005.
- APELDOORN, M. E.; EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, 51:7- 60, 2007.
- AZEVEDO, S. M.F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E.; RINEHART, K.; LAU, S.; SHAW, G. & EAGLESHAM, G. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru- Brazil. **Toxicology**, 181:441- 446, 2002.
- 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.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., SANTOS, D.M.S.; MOURA, N.A. Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using a molecular method. **Braz. J. Biol.**, vol. 70, no. 4, p. 1005-1010, 2010.
- BLADT, T. T.; KALIFA-AVIV, S.; LARSEN, T. O.; CARMELI, S. Micropeptins from *Microcystis* sp. collected in Kabul Reservoir, Israel. **Tetrahedron**, 70, 936-943, 2014.

- BOWNIK, A.; Harmful algae: Effects of cyanobacterial cyclic peptides on aquatic invertebrates-a short review, **Toxicon**, 2016, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.10.017.
- BOUHADDADA, R.; NÉLIEU, S.; NASRI, H.; DELARUE, G.; BOUAÏCHA, N. High diversity of microcystins in a *Microcystis* bloom from an Algerian lake. **Environmental Pollution**, 1-9, 2016.
- BURATTI, F. M.; MANGANELLI, M.; VICHI, S.; STEFANELLI, M.; SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch. Toxicol**, 2017.
- CALIJURI, Maria do Carmo; SANTOS, André Cordeiro Alves dos; ALVES, Michaela Suely Adriani. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos: Rima, 109 p, 2006.
- CARNEIRO, R. L.; DORR, F. A.; DORR, F.; BORTOLI, S.; DELHERBE, N.; VÁSQUEZ, M.; PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiol Ecol.**, 82, 692–702, 2012.
- CARVALHO, L. R.; PIPOLE, F.; WERNER, V. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; CAMARGO, A. C. M.; RANGEL, M.; KONNO, K.; SANT' ANNA, C. L. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:761-769, 2008.
- CERBIN, S.; KRAAK, M. H. S.; VOOGT, P.; VISSER, P. M.; DONK, E. V. Combined and single effects of pesticide carbaryl and toxic *Microcystis aeruginosa* on the life history of *Daphnia pulicaria*. **Hydrobiologia**, 643:129–138, 2010.
- CHATZIEFTHIMIOU, A. D.; RICHER, R. A.; ROWLES, H.; POWELL, J. T.; METCALF, J.S. Cyanotoxins as a potential cause of dog poisonings in desert environments. **Veterinary Record**, 174: 484-485, 2014, doi: 10.1136/vr.g3176.
- CHATZIEFTHIMIOU, A. D.; METCALF, J.S.; GLOVER, W. B.; BANACK, S. A.; DARGHAM, S. R.; RICHER, R. A. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. **Toxicon**, 114, 75-84, 2016.

CHEN, W.; SONG, L.; OU, D.; GANL, N. Chronic Toxicity and Responses of Several Important Enzymes in *Daphnia magna* on Exposure to Sublethal Microcystin-LR. **Wiley Periodicals**, 2005.

CHEN, F.; DAI, X.; SHU, T., GULATI, R. D.; LIU, Z. Microcystins derived from lysing *Microcystis* cells do not cause negative effects on crustacean zooplankton in Lake Taihu, China. **Aquat Ecol**, 47:379–387, 2013.

CHEN, L.; HU, Y.; HE, J.; CHEN, J.; GIESY, J. P.; XIE, P. Responses of the proteome and metabolome in livers of zebrafish exposed chronically to environmentally relevant concentrations of microcystin-LR. **Environmental Science & Technology**, 2016.

CHELLAPPA, N.T.; CHELLAPPA, S.L.; CHELLAPPA, S. Harmful Phytoplankton Blooms and Fish Mortality in a eutrophicated reservoir os Northeast Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.4, p. 833- 841, 2008.

CHIA, M. A.; KWAGHE, J. M. Microcystins contamination of surface water supply sources in Zaria-Nigeria. **Environ Monit Assess**, 187: 606, 2015.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering**, 16:51-60, 2000.

COSTA, I. A. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; SENNA, P. A. C.; BERNARDO, R. R.; COSTA, S. M.; CHELLAPPA, N. T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a brazilian semiarid reservoir. **Braz. J. Biol.**, 66(1B): 211-219, 2006.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008.

COSTA, S. M.; FERRÃO-FILHO, A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of saxitoxin- and non-saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans. **Harmful Algae**. 28, 55–63, 2013.

DAO, T. S.; DO-HONG, L.C.; WIEGAND, C. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**, 55, 1244–1254, 2010.

DAMME, K. V.; KOTOV, A. A. The fossil record of the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda): Evidence and hypotheses. **Earth-Science Reviews**, 163, 162–189, 2016

DANTAS, E.W.; MOURA, A.N.; BITTENCOURT- OLIVEIRA, M.C.; NETO, J.D.T.A.; CAVALCANTI, A.D.C. Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brazil. **Act. Botânica Brasílica**, v.22, n.4, p.970-982, 2008.

DEMOTT, W.R. & DHAWALE, S. Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplâncton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. **Archive für Hydrobiologie**, 134: 417-424, 1995.

DITTMANN, E.; ERHARD, M.; KAEBERNICK, M.; SCHELER, C.; NEILAN, B.; VON DÖHREN, H. & BÖRNER T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Microbiology**, 147: 3119-3133, 2001.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **Fems Microbiology Reviews**, 37:23-43, 2013.

EPA- United States Environmental Protection Agency. Cyanobacteria and cyanotoxins: Information for drinking water systems. 2014. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-8/documents/cyanobacteria\\_factsheet.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-8/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf). Acessado em : 16/12/2016.

EPA- United States Environmental Protection Agency. Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. 2015. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/microcystins-report-2015.pdf>. Acessado em: 16/12/2016.

FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L.B.; SOUZA, B.A. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e conseqüências das florações. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p.247-258, 2009.

FERRÃO- FILHO, A.S.; AZEVEDO, S. M.F.O.: DEMOTT, W. R. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. **Freshwater Biology**, 45, 1–19, 2000.

FERRÃO- FILHO, A.S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquatic Toxicology**, 59, 201–208, 2002.

FERRÃO- FILHO, A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. **Aquatic Ecology**, 37: 23- 35, 2003.

FERRÃO- FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 13 (2): 272-312, 2009.

FERRÃO- FILHO, A. S. & KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. **Mar. Drugs**, 9, 2729-2772, 2011.

FERRÃO- FILHO, A.S.; GALVÃO, L.E.C.; MAGALHÃES, V.F. Differential susceptibility of cladoceran species to a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v. 9, n. 1,33-41, 2014a.

FERRÃO- FILHO, A.S.; HERRERA, N. A.; ECHEVERRI, L. F. Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. **Toxicol**, 87, 26-31, 2014b.

FERRÃO- FILHO, A.S.; SOARES, M. C. S.; LIMA, R. S.; MAGALHÃES, V. F. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (cladocera). **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 33, No. 1, pp. 223–229, 2014c.

FREITAS, E.C.; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran *Pseudosida ramosa*: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Arch Environ Contam Toxicol**, 60:241–249, 2011.

FREITAS, E.C.; PRINTES, L.B.; ROCHA, O. Acute effects of *Anabaena spiroides* extract and paraoxon- methyl on freshwater cladocerans from tropical and temperate regions: links between the ChE activity and survival and its implications for tropical ecotoxicological studies. **Aquatic Toxicology**, 146: 105- 114, 2014.

GER, K.A.; TEH, S. J.; GOLDMAN, C. R. Microcystin-LR toxicity on dominant copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi* of the upper San Francisco Estuary. **Science of the Total Environment**, 407, 4852–4857, 2009.

GER, K.A.; TEH, S. J.; D.V. BAXA; S. LESMEISTER; GOLDMAN, C. R. The effects of dietary *Microcystis aeruginosa* and microcystin on the copepods of the upper San Francisco Estuary. **Freshwater Biology**, 55, 1548–1559, 2010.

GENG, H.; XIE, P. Experimental studies on the effects of toxic *Microcystis aeruginosa* PCC7820 on the survival and reproduction of two freshwater rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus rubens*. **Ecotoxicology**, v. 17, 709-715, 2008.

GRAHAM, J.L.; LOFTIN, K.A.; ZIEGLER, A.C.; MEYER, M.T. 2008. **Guidelines for design and sampling for cyanobacterial toxin and taste-and-odor studies in lakes and reservoirs**: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2008–5038, 39 p.

GUPTA, S.C.N.; VIJAYARAGHAVAN, P.R.; RAO, P.V. L. Comparative toxicology evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, 188, 285–296, 2003.

HOLLAND, A.; KINNEAR, S. Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide? **Marine Drugs**, 11:2239:2258, 2013.

HERRERA, N. A.; PALACIO, J.; F. ECHEVERRI; FERRAO-FILHO, A. Effects of a cyanobacterial bloom sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. **Toxicology Reports**, 1, 909–914, 2014.

HERRERA, N.A.; ECHEVERRI, L. F.; FERRAO-FILHO, A. S. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans, **Toxicon**, 95, 38-45, 2015.

HUANG, X.; CHEN, L.; LIU, W.; QIAO, Q.; WU, K.; WEN, J.; HUANG, C.; TANG, R.; ZHANG, X. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. **Aquatic Toxicology**, 2015.



HUDNELL, H. K.; DORTCH, Q. "Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: Chapter 2: A Synopsis of Research Needs Identified at the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB)" U.S. **Environmental Protection Agency Papers**. 38, 2008. <http://digitalcommons.unl.edu/usepapapers/38>. Acessado em : 15/06/2017.

ISAACS, J. D.; STRANGMAN, W. K.; BARBERA, A. E.; MALLIN, M. A.; MCIVER, M. R.; WRIGHT, J. L.C. Microcystins and two new micropeptin cyanopeptides produced by unprecedented *Microcystis aeruginosa* blooms in North Carolina's Cape Fear River. **Harmful Algae**, 31, 82–86, 2014.

KOREIVIENĖ, J.; BELOUS, O.; KASPEROVICIENĖ, J. Variations of microcystins in freshwater ecosystems. **Botanica Lithuanica**, 19(2): 139–148, 2013.

LAGO, L.; BARCA, S.; VIEIRA-LANERO, R.; COBO, F. Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de As Forcadas (Galicia, NW España). **Limnetica**, 34 (1): 187-204, 2015.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, 13 (2): 229-246, 2009.

MOHAMED, Z. A.; DEYAB, M. A.; ABOU-DOBARA, M. I.; EL-SAYED, A. K.; EL-RAGHI, W. M. Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile River, Egypt: implication for water treatment and human health. **Environ Sci Pollut Res**, 22:11716–11727, 2015

NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; WATANABE, M. F.; ODA, T.; YAMADA, J.; TSUJIMURA, S.; NAGAI, H.; OISHI, S. Simultaneous production of homoanatoxin- a, anatoxin- a, and a new non- toxic 4 hydroxyhomoanatoxin- a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterrânea* Skuja. **Toxicon**, 42: 533-538, 2003.

PAERL, H.W.; TUCKER, J. & BLAND, P.T. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue- green (*Microcystis aeruginosa*) surface florações. **Oceanography**, 28:847-857, 1983.

PAERL, H.W. Nutrient and Other Environmental Controls of Harmful Cyanobacterial Florações along the freshwater-marine continuum. In: H.K. Hudnell (ed.). Cyanobacterial

Harmful Algal Florações: state of Science and Research Needs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 619, p. 217-213, 2008.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, 1(1), 27–37, 2009.

PAERL, H.W. Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. **Life**, 4, 988-1012, 2014.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M. R.; WOOD, S. A.; KAUFONONGA, S. A. F.; CARY, S. C.; HAMILTON, D. P. High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. **Marine Drugs**, 12, 5372-5395, 2014.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M. R.; WOOD, S. A.; CARY, S. C.; HAMILTON, D. P.; HOLLAND, P.T. Further characterization of glycine-containing microcystins from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. **Toxins**, 7, 493-515, 2015.

QIAO, Q.; MANACH, S. L.; HUET, H.; BERTHET, E. D.; CHAOUCH, S.; DUVAL, C.; SOTTON, B.; PONGER, L.; MARIE, A.; MATHERON, L.; LENNON, S.; BOLBACH, G.; DJEDIAT, C.; BERNARD, C.; EDERY, M.; MARIE, B. An integrated omic analysis of hepatic alteration in medaka fish chronically exposed to cyanotoxins with possible mechanisms of reproductive toxicity. **Environmental Pollution**, 219, 119-131, 2016.

RESTANI, G. C.; FONSECA, A. L. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains (Woloszynska, 1912) Senayya & Subba Raju on the mobility of *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphniidae). **Braz. J. Biol.**, vol. 74, nº. 1, p. 23-31. 2014.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; DITTMANN, E.; Nogueira, I.; Vasconcelos, V. & BÖRNER, T. Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. **Limnology and Oceanography**, 50: 440-448, 2005.

ROJO, C.; SEGURA, M.; CORTÉS, F.; RODRIGO, M. A. Allelopathic effects of microcystin-LR on the germination, growth and metabolism of five charophyte species and a submerged angiosperm. **Aquatic Toxicology**, 144-145, 1-10, 2013.

ROMERO-OLIVA, C. S.; CONTARDO-JARA, V.; BLOCK, T.; PFLUGMACHER, S. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops – A case study

from lake Amatitlán, Guatemala. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 102, 121–128, 2014.

SADLER, T.; VON ELERT, E. Dietary exposure of *Daphnia* to microcystins: No in vivo relevance of biotransformation. **Aquatic Toxicology**, 150, 73-82, 2014a.

SADLER, T.; VON ELERT, E. Physiological interaction of *Daphnia* and *Microcystis* with regard to cyanobacterial secondary metabolites. **Aquatic Toxicology**, 156, 96-105, 2014b.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M. T. P.; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. **Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. Rev. bras. Bot. [online].** vol.27, n.2, pp. 213-227, 2004.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R. & SOUZA, R.C.R. **Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras.** Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 58 p, 2006.

SEMYALO, R.; ROHRLACK, T.; LARSSON, P. Growth and survival responses of a tropical *Daphnia* (*Daphnia lumholtzi*) to cell-bound microcystins. **Journal of Plankton Research**, 31, 8, 827-835, 2009.

SILVA-STENICO, M. E.; LORENZI, A. S.; SILVA, C. S. P.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F. **Oecologia Australis**, 16(2): 183-209, 2012.

SIPAÚBA- TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Rima, São Carlos, 106 p., 2001.

SOARES, R. M. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas as estrelas do tema. **Oecologia Brasiliensis**, 13(2): 259-271, 2009.

SUHETT, A. L.; SANTANGELO, J. M.; BOZELLI, R. L.; STEINBERG, C. E. W.; FARJALLA, V. F. An overview of the contribution of studies with cladocerans to environmental stress research. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 27(2), 145-159, 2015.

SMUTNÁ, M.; BABICA, P.; JARQUE, S.; HILSCHEOVÁ, K.; SÁLEK, B. M.; HAEBBA, M.; BLÁHA, L. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. **Toxicon**, 79, 11–18, 2014.

- SCHWARZENBERGER, A.; ZITT, A.; KROTH, P.; MUELLER, S.; VON ELERT, E. Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. **BMC Physiology**, 10:6, 2010.
- TAN, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, 68, 954–979, 2007.
- TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & SubaRaju (Cyanobacteria): variação seminal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 26: 97, 2003.
- UTKILEN, H.; GJØLME, N. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 61, No. 2, 797–800, 1995.
- VEGMAN, M.; CARMELI, S. Eight micropeptins from a *Microcystis* spp. bloom collected from a fishpond near Kibbutz Lehavot HaBashan, Israel. **Tetrahedron**, 69, 10108-10115, 2013.
- VESTERKVIST, P. S. M.; MISIOREK, J. O.; SPOOF, L. E. M.; TOIVOLA, D. M.; MERILUOTO, J. A. O. Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 Cells. **Toxins**, 4, 1008-1023, 2012.
- VILAR, M.C.P.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; MOURA, A.N. Acute toxicity of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) bloom on *Moina minuta* (Cladocera) in a tropical reservoir, Northeastern Brazil. **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v. 09, n. 1, 93-98, 2014.
- WEHR, J.D.; SHEATH, R. G. Freshwater habitats for Algae. Pp. 11- 58. In: J. D. Wehr & R. G. Sheath (eds). **Freshwater algae of North America**. Academic Press, London, 2009p, 2003.
- WELKER, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; DOHREN, H. V. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, 27, 2090 – 2103, 2006.
- YUNES, J. S. Florações de *microcystis* na lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. **Oecol. Bras.**, 13(2): 313-318, 2009.
- ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins- a review. **Mutation Research**, 727: 16- 41, 2011.

**6. ARTIGO:**

A toxicidade das microcistinas em cladóceros tropicais varia em função da via de exposição?

Artigo a ser submetido para a *Environmental Toxicology and Chemistry*

1 A TOXICIDADE DAS MICROCISTINAS EM CLADÓCEROS TROPICAIS VARIA EM  
2 FUNÇÃO DA VIA DE EXPOSIÇÃO?

3  
4 Running title: Toxicidade de microcistinas em cladóceros

5  
6  
7 ALANE S. A. SANTOS<sup>1</sup>, MAURO C.P. VILAR<sup>2</sup>, RENATO J.R. MOLICA<sup>3</sup>, ARIADNE N.  
8 MOURA<sup>1\*</sup>

9  
10  
11 <sup>1</sup>Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Microalgas, Programa de Pós-Graduação  
12 em Ecologia/ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

13 <sup>2</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
14 Brasil,

15 <sup>3</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns- Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
16 Brasil

17  
18  
19 \*Autor para correspondências: ariadne\_moura@hotmail.com  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34 **Resumo.** No presente estudo, nós verificamos a toxicidade aguda e crônica de *Microcystis*  
35 *aeruginosa* NPLJ-4, produtora de microcistinas, sobre cladóceros tropicais: dois clones de  
36 *Macrothrix spinosa* e um de *Ceriodaphnia cornuta*, sob duas vias de exposição, células intactas  
37 e extratos brutos. Foi testada a hipótese de que cladóceros apresentam maior sensibilidade às  
38 microcistinas quando submetidos à exposição através da ingestão de células intactas. No ensaio  
39 agudo, foi verificada a mortalidade dos animais expostos à *M. aeruginosa*, enquanto que no  
40 crônico foram avaliados a sobrevivência, fecundidade média, idade da primeira reprodução e a  
41 taxa de crescimento somático e populacional. No ensaio agudo, foi verificado que os cladóceros  
42 foram mais sensíveis às células intactas, com CL<sub>50</sub> de 0,22, 0,09 e 0,04 mgC L<sup>-1</sup> para *C. cornuta*,  
43 *M. spinosa* (Duas Unas-reservatório eutrofizado) e *M. spinosa* (Prata-reservatório oligotrófico),  
44 respectivamente. A sobrevivência, crescimento somático, idade da primeira reprodução,  
45 números de neonatos e taxa de crescimento populacional dos microcrustáceos diminuíram  
46 significativamente quando expostos as células intactas de *M. aeruginosa*. Entretanto, mesmo  
47 com concentrações elevadas de microcistinas, o extrato bruto não casou efeitos crônicos  
48 significativos sobre os animais, o que sugere que a absorção de microcistina é maior com a  
49 ingestão de células intactas.

50

51 **Palavras-chave:** cianobactérias, cianotoxinas, microcrustáceos, concentração letal média,  
52 parâmetros populacionais.

53

54

## 55 INTRODUÇÃO

56 Altas concentrações de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, associado com  
57 altas temperaturas favorecem a formação de florações de cianobactérias [1]. Esses eventos  
58 interferem no funcionamento dos ecossistemas aquáticos e causam riscos à saúde humana [2,3].  
59 O mais preocupante, é que algumas espécies desse grupo produzem cianotoxinas, as quais são  
60 classificadas de acordo com seus mecanismos de ação em hepatotoxinas, neurotoxinas,  
61 citototoxinas e dermatotoxinas [4] e são caracterizadas quimicamente em peptídeos cíclicos,  
62 alcaloides e lipopolissacarídeos de membrana [5].

63 As hepatotoxinas são as mais estudadas, sendo caracterizadas como peptídeos cíclicos  
64 inibidores de proteínas fosfatase 1 e 2A. Dentre estas, as microcistinas (MCs) são as mais  
65 reportadas na literatura, por sua maior ocorrência e predominância de espécies produtoras desta  
66 toxina nos ambientes de água doce [6,7], apresentando mais de 100 análogos.

67 A variação de aminoácidos, principalmente nas posições 2 e 4 em radicais e/ou cadeias  
68 laterais específicas e as desmetilações nas posições 3 e 7 e as raras substituições de D-alanina  
69 na posição 1, são os fatores responsáveis pelo grande número de análogos [8,9,10],  
70 sendo produzidas pelos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*,  
71 *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon* e *Radiocystis* [11].

72 Os efeitos tóxicos das microcistinas foram descritos em mamíferos, incluindo o homem,  
73 causando insuficiência hepática aguda, levando a morte e formando tumores em exposição a  
74 baixas concentrações dessas toxinas [12-15]; macrófitas aquáticas, reduzindo a germinação e  
75 crescimento dessas plantas [16,17,18]; peixes, causando danos celulares ao fígado, alterações  
76 das funções hepáticas [19,20,21] e, principalmente, no zooplâncton, afetando negativamente a  
77 sobrevivência, reprodução e crescimento de espécies de copépodes [22,23,24], rotíferos  
78 [25,26,27] e cladóceros [28-31]. Estes últimos são os mais utilizados em experimentos de  
79 toxicidade [32-36] por apresentarem um papel central na cadeia alimentar, ciclo de vida curto,  
80 reprodução por partenogênese e pelo pequeno tamanho corporal [37].

81 Os efeitos tóxicos de microcistinas em cladóceros podem ser agudos, podendo levar a  
82 morte em um curto intervalo de tempo, e crônicos, causando efeitos em baixas concentrações a  
83 longo prazo. A reação desses animais às toxinas depende da espécie de cianobactéria, da  
84 concentração e tipo de toxina, espécie de cladóceros testada e do modo de exposição (células  
85 intactas, extratos, toxinas purificadas), sendo este último o que mais influencia na toxicidade  
86 de cladóceros [38].

87 Os organismos aquáticos podem ser expostos as cianotoxinas através da ingestão de  
88 células intactas, sendo absorvidos pelo trato gastrointestinal, e por via superfície corpórea ou



89 respiratória absorvendo toxinas dissolvidas no meio [39]. Na natureza, cladóceros são expostos  
90 às cianotoxinas extracelulares (dissolvidas na coluna d'água), que são liberadas durante a  
91 senescência da floração, após lise celular induzida (por exemplo, aplicação de algicidas) ou  
92 liberação ativa por células saudáveis e às toxinas intracelulares (através da ingestão de células)  
93 que aumentam com o estabelecimento da floração [40].

94 Durante a maior parte do tempo de uma floração, as microcistinas são mantidas, em  
95 geral, intracelularmente e as concentrações dissolvidas nunca representam mais de 30% das  
96 concentrações totais [41]. Desta forma, os cladóceros estão expostos por mais tempo às toxinas  
97 intracelulares e os animais ao ingerir as mesmas, podem ser expostos a uma dose  
98 significativamente maior de microcistinas [11]. Com isso, a exposição às microcistinas, através  
99 da ingestão de células, tem sido considerada a via de exposição de maior preocupação [33].

100 Em trabalhos de toxicidade, espécies de cladóceros de ambientes temperados são mais  
101 estudadas [31-33,35,42-44], fazendo-se necessário mais estudos com espécies tropicais [45],  
102 para um melhor entendimento dos ecossistemas tropicais, onde as florações tendem a ser mais  
103 persistentes, ocorrendo durante períodos que podem se estender por mais de um ano e os  
104 animais estão expostos por mais tempo a esses eventos [38].

105 Considerando a interferência negativa das cianobactérias sobre o zooplâncton, e a  
106 exposição dos cladóceros às toxinas intracelulares e extracelulares nos ambientes aquáticos,  
107 verificamos a premente necessidade de se estudar os efeitos adversos de *M. aeruginosa*  
108 produtora de microcistinas, em espécies de cladóceros tropicais sob essas duas vias de  
109 exposição, contribuindo para o conhecimento da sensibilidade desses animais, bem como, para  
110 o entendimento do papel dessas toxinas nos ecossistemas aquáticos tropicais.

111

## 112 **MATERIAIS E MÉTODOS**

113

### 114 *Manutenção dos cladóceros*

115 Foram usados neste estudo cladóceros nativos isolados de reservatórios localizados no  
116 Estado de Pernambuco, Brasil: *Macrothrix spinosa* King, 1853 clone do Açude do Prata  
117 (ambiente oligotrófico) e clone do Reservatório de Duas Unas (ambiente eutrofizado), e um  
118 clone de *Ceriodaphnia cornuta* Sars, 1885 isolado do Reservatório de Duas Unas. O  
119 comprimento médio corporal desses animais adultos foi de  $0,945 \pm 0,02$ ;  $0,960 \pm 0,01$  e  $0,568$   
120  $\pm 0,01$ mm, respectivamente.

121 Os cladóceros foram mantidos em béqueres de 1 L em água reconstituída: 70% de água  
122 mineral, 30% de água de riacho filtrada (copo coletor com abertura de malha de 20  $\mu$ m) e 250

123  $\mu\text{L L}^{-1}$  ( $\sim 3 \text{ mg C L}^{-1}$ ) de extrato de ácido húmico (Blackwater, Tetra®), sob pH 7,5, a  $25 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$   
 124 e fotoperíodo de 12 horas, e alimentados com  $0,50 \text{ mg C L}^{-1}$  da alga verde *Ankistrodesmus*  
 125 *falcatus* (Corda) Ralfs, 1848, todos os dias.

126

#### 127 *Cultivo das linhagens de cianobactéria e alga verde*

128 Foi usada a cepa *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 NPLJ-4 (Isolada da  
 129 Lagoa de Jacarepaguá, RJ), produtora de cinco congêneres de microcistina, das quais [D-Leu<sup>1</sup>]  
 130 MC-LR representa cerca de 90% do total de microcistina produzida [46]. Para alimentar os  
 131 animais foram mantidas culturas estoque da alga verde *Ankistrodesmus falcatus*, gentilmente  
 132 cedida pelo professor Aloysio S. Ferrão-Filho (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ).

133 Estes microrganismos foram cultivados em meio ASM-1 [47], sob as seguintes  
 134 condições: pH 7,5,  $24^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ ,  $\sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (lâmpadas fluorescentes General Eletric 40  
 135 watts) e fotoperíodo de 12 horas.

136

#### 137 *Estimativa da biomassa em carbono nas culturas de cianobactéria e alga verde*

138 As concentrações de células intactas e extrato bruto, utilizadas nos ensaios agudos e  
 139 crônicos, foram baseadas na concentração de carbono, sendo expressas em miligramas de  
 140 carbono por litro ( $\text{mg C L}^{-1}$ ). Para chegar a esta concentração, foi calculado o biovolume [48,  
 141 49] e a partir deste a quota de carbono celular [50] de *M. aeruginosa* e *A. falcatus* e  
 142 posteriormente foi calculado a concentração de carbono, através da seguinte fórmula:

$$143 \text{ **Concentração de carbono} = \text{Densidade celular (cél/ml)} \times \text{quota de carbono celular (pg C/cél)}**$$

$$144 \qquad \qquad \qquad \times 10^{-6} \times 1000$$

145 Em que,

146 Densidade celular = estimada em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico.

147 Quota de carbono celular = calculada a partir da fórmula de Rocha e Duncan [50].

148  $10^{-6}$  = conversão de pg C/cél para  $\mu\text{g C ml}^{-1}$ .

149 1000 = conversão de  $\mu\text{g C/ml}^{-1}$  para  $\text{mg C L}^{-1}$ .

150

#### 151 *Obtenção de biomassa e preparação do extrato bruto de Microcystis aeruginosa*

152 No ensaio agudo a linhagem de *M. aeruginosa* foi cultivada em sistema fechado aerado  
 153 em erlenmeyers de 1,5 L, nas condições descritas acima e na fase exponencial de seu  
 154 crescimento, foram retiradas alíquotas para os ensaios agudos e para análise de microcistinas.

155 No ensaio crônico, para garantir a utilização de culturas em fase exponencial, foram inoculados

156 cinco cultivos dessa linhagem a cada três dias, durante os 15 dias de experimento e no sétimo  
157 dia de cada cultura eram retiradas as alíquotas para os ensaios crônicos e análise de microcistina.

158 A preparação das concentrações de células intactas foi realizada a partir do cultivo de  
159 *Microcystis aeruginosa*, centrifugado em centrífuga modelo ST 16R, da marca Sorvall, a 5000  
160 rpm durante 10 minutos, para obtenção de culturas concentradas e após centrifugação foi  
161 retirada uma alíquota para contagem da densidade celular (Cél mL<sup>-1</sup>) em câmara de Fuchs-  
162 Rosenthal.

163 Para a preparação do extrato bruto, a amostra foi centrifugada e a contagem de células,  
164 foi realizada conforme descrito anteriormente. Posteriormente, o concentrado de células foi  
165 congelado e descongelado três vezes e depois sonicado em lavadora ultrasônica modelo  
166 UltraCleaner 1400 da marca Unique, em dois ciclos de 5 minutos a uma frequência de 20 kHz,  
167 para lise de células e exposição do conteúdo intracelular.

168 Lâminas foram preparadas para verificar se todas as células foram rompidas, e  
169 analisadas em microscópio óptico Primo Star da marca Zeiss em objetiva de 40x. Este material  
170 foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos em uma centrífuga modelo ST 16R, da marca  
171 Sorvall, sendo o sobrenadante utilizado para a preparação por diluição em água constituída, de  
172 diferentes concentrações de extrato bruto a ser testado (adaptado de [51]).

173

#### 174 *Extração e análise de microcistinas (HPLC-PDA)*

175 Para extração de microcistinas, as amostras utilizadas nos ensaios foram liofilizadas em  
176 liofilizador modelo LD 3000 da marca Terroni e pesadas, para o conhecimento da biomassa  
177 total seca. Posteriormente, foi adicionado metanol 75%. Esta solução foi mantida sob agitação  
178 com auxílio de um agitador magnético modelo 78HW-1 da marca Vertex, por 1 hora. Após este  
179 tempo, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante reservado em  
180 béquer. Este processo de extração foi repetido por duas vezes, porém, com o tempo reduzido  
181 para 30 minutos [52]. Depois da junção dos três sobrenadantes oriundos das três extrações, foi  
182 realizada a secagem dos mesmos, sob ar quente. Por fim, o material seco foi ressuscitado em  
183 2 mL de metanol 20% grau HPLC, transferido para um eppendorf de 2 mL, depois centrifugado  
184 em centrífuga modelo Mikro 200R, da marca Hettich e o sobrenadante foi armazenado em vial  
185 e mantido a -18°C até o momento da análise.

186 A microcistina foi analisada por um equipamento de cromatografia líquida de alta  
187 eficiência-HPLC modelo LC20A, Linha Prominence, da Shimadzu-Japão, equipado com  
188 Coluna Luna 5µ de C18 (2) 100 A (250 x 4,6 mm) da marca Phenomenex, detector de UV-Vis  
189 com arranjo de diodo, forno a 40°C e um gradiente de água ultrapura e acetonitrila, ambos com

190 adição de ácido trifluoracético 0,05% [53]. O fluxo de fase móvel foi de 1 ml/min, começando  
191 com 30% de acetonitrila aumentando para 35% dentro de 10 minutos e nos 30 minutos seguintes  
192 a proporção mudou para 70% de acetonitrila e assim sucessivamente. O volume de injeção das  
193 amostras foi de 40 µL. O monitoramento dos cromatogramas foi feito em 238 nm e o espectro  
194 de absorção dos picos monitorados entre 200 e 300 nm.

195 A identificação das microcistinas produzidas por *M. aeruginosa* NPLJ-4 foi realizada  
196 pela comparação dos espectros de absorção dos picos dos cromatogramas com o espectro de  
197 absorção do padrão de microcistina-LR. Foi construída uma curva de calibração, com 6  
198 amostras padrões de MC-LR, em diferentes concentrações (2, 5, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

199

### 200 *Desenho experimental*

201 *Ensaio de toxicidade aguda.* As populações de cladóceros foram submetidas a dois  
202 tratamentos: I) Células intactas da cepa NPLJ-4 e controle alimentado com a alga verde *A.*  
203 *falcatus* em concentração de 0,50 mg C L<sup>-1</sup>; II) Extrato bruto da cepa NPLJ-4 e controle sem  
204 alimento. Neste ensaio foram observados os efeitos de *M. aeruginosa* NPLJ-4, sob a  
205 mortalidade das espécies de cladóceros. Dez neonatos (<24h) de cada clone/espécie foram  
206 colocados em cada tubo de ensaio contendo cinco concentrações de extrato (equivalente em  
207 carbono celular, mg C L<sup>-1</sup>), com 4 réplicas cada. As concentrações de células intactas e extrato  
208 bruto utilizadas foram: para *M. spinosa* (Prata) e *Ceriodaphnia cornuta* (Duas Unas) 0,03; 0,06;  
209 0,12; 0,25 e 0,50 mg C L<sup>-1</sup> e para *M. spinosa* (Duas Unas), foram: 0,04; 0,08; 0,15; 0,30; 0,60  
210 mg C L<sup>-1</sup>. Estas concentrações foram determinadas após teste preliminar. Ao final destes  
211 ensaios, o número de indivíduos mortos em cada concentração e no controle foi contabilizado  
212 após 48h de experimento, para o cálculo da CL<sub>50</sub>.

213 *Ensaio de toxicidade crônica.* Os microcrustáceos foram expostos a diferentes  
214 proporções de cianobactéria e alga verde: Nos ensaios com células intactas, foram utilizadas  
215 concentrações de *M. aeruginosa* de 0,012, 0,025 e 0,05 mg C L<sup>-1</sup> para *M. spinosa* e 0,025, 0,05  
216 e 0,1 mg C L<sup>-1</sup> para *C. cornuta*, com concentração final de 0,5 mg C L<sup>-1</sup> depois de alimentados  
217 com a alga verde *A. falcatus*. Nos ensaios com extrato bruto de *M. aeruginosa* foram utilizadas  
218 as concentrações 0,12, 0,25 e 0,50 mg C L<sup>-1</sup> para as duas espécies de cladóceros, que foram  
219 alimentadas com 0,50 mg C L<sup>-1</sup> de alga verde *A. falcatus*. Os controles consistiram de animais  
220 alimentados com alga verde *A. falcatus* sempre na concentração de 0,50 mg C L<sup>-1</sup>. As  
221 concentrações utilizadas foram determinadas a partir dos dados de CL<sub>50</sub> do ensaio agudo.

222 O efeito crônico de *Microcystis aeruginosa* foi testado sob a sobrevivência (lx),  
223 reprodução (Idade da primeira reprodução, número de neonatos e fecundidade média) e

224 crescimento (somático e populacional) de *M. spinosa* e *C. cornuta*. A fecundidade média é  
 225 estimada através dos números totais de neonatos dividido pelo número de ninhadas. Foram  
 226 utilizados os clones *M. spinosa* e *C. cornuta* (DUAS UNAS), considerados os menos sensíveis  
 227 com maiores CL<sub>50</sub>.

228 Um neonato de cada cladóceros, de idade entre 6 e 24 horas foi colocado em cada tubo,  
 229 com diferentes concentrações subletais de células intactas e extrato bruto em 10 réplicas. A  
 230 duração do experimento foi de 15 dias, tempo suficiente para que os animais alcançassem a  
 231 terceira ninhada.

232 A renovação do meio de cultivo foi efetuada diariamente durante o experimento e os  
 233 organismos foram transferidos para uma solução nova, já com alimento. E a cada renovação o  
 234 número de organismos sobreviventes foi registrado e, no início e final dos bioensaios, foi  
 235 mensurado o comprimento do corpo dos animais para calcular a taxa de crescimento somático  
 236 de acordo com [33], seguindo a equação:

$$237 \quad G = \ln (I_f - I_i) / T$$

238 Em que,

239  $I_i$  = comprimento do corpo de neonatos no início.

240  $I_f$  = comprimento dos animais sobreviventes no final dos bioensaios.

241  $T$  = tempo de crescimento em dias.

242 Foram mensurados 10 animais da mesma ninhada utilizada nos ensaios, para obtenção  
 243 do tamanho corporal dos neonatos no início do experimento.

244 A taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) foi calculada segundo a equação de  
 245 Euler:

$$246 \quad l = \sum l_x m_x e^{-rx}$$

247 Em que,

248  $l_x$  = sobrevivência específica da idade, calculada como a taxa de sobrevivência relativa,  
 249 dividindo o número de sobreviventes em cada dia pelo número de réplicas no início do teste.

250  $M_x$  = fecundidade específica da idade, como a prole total produzida em cada dia dividida pelo  
 251 número de fêmeas sobreviventes.

252  $x$  = idade em dias.

253 Esta taxa foi calculada no programa Rm 2.0 [54], pela técnica de bootstrap que produziu  
 254 500 estimativas bootstrapped. Para cada valor médio de  $r$  foram gerados valores de erro padrão  
 255 e intervalo de confiança de 95%.

256

257

## 258 *Análises estatísticas*

259 Para efeitos agudos, as concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) foram estimadas pelo método  
260 Trimmed Spearman-Kärber [55]. Para identificar diferenças significativas entre as vias de  
261 exposição, concentrações testadas, bem como a interação entre vias de exposição e  
262 concentrações utilizou-se uma ANOVA two-way, após análise da normalidade dos dados e  
263 homocedasticidade das variâncias. E foi realizado um teste de Holm-Sidak *a posteriori* para  
264 mostrar diferenças significativas da mortalidade entre as concentrações e vias de exposição. Os  
265 testes foram realizados no programa SigmaPlot 11.0 Statistical package.

266 No ensaio crônico, foi realizada para a idade da primeira ninhada, total de neonatos,  
267 fecundidade média e crescimento somático de cada espécie de cladóceros, uma ANOVA (one-  
268 way) para verificar se houve diferenças significativas entre os diferentes níveis de  
269 concentrações de células intactas e extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4 e foi realizado um  
270 teste de Tukey ( $p < 5\%$ ) para mostrar essas diferenças. Foi utilizado o programa R para a  
271 realização dessas análises. Para mostrar diferenças significativas da taxa intrínseca de aumento  
272 populacional ( $r$ ) entre o controle e os tratamentos com cianobactéria usamos o teste t pareado  
273 ( $p < 0,05$ ) realizado no programa Primer.

274

## 275 **RESULTADOS**

276

277 O cromatograma do padrão de microcistinas e espectro da curva padrão de  
278 microcistinas- LR são mostrados no apêndice 1. E da amostra de *M. aeruginosa* NPLJ-4 estão  
279 no apêndice 2.

280

### 281 *Ensaio de toxicidade aguda*

282 Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, vias de exposição, bem  
283 como, uma interação entre esses fatores em relação a mortalidade dos três clones de cladóceros  
284 estudadas (**Tabela 1**).

285 As concentrações de microcistinas foram mais baixas nos tratamentos de células intactas  
286 do que nos tratamentos com extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 (**Tabela 2**).  
287 Mesmo assim, os animais foram mais sensíveis quando expostos a células intactas,  
288 apresentando uma maior porcentagem de mortalidade, que variou de 80-92,5 % nas maiores  
289 concentrações. Quando expostos ao extrato bruto, os animais foram menos afetados, com

290 aumento significativo da mortalidade apenas nas maiores concentrações com 32,5-47,5 % de  
291 mortalidade (**Figura 1**).

292 Na exposição a células intactas todos os tratamentos apresentaram diferenças  
293 significativas em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) para os três clones de cladóceros estudados.  
294 Porém, na exposição ao extrato bruto apenas as concentrações 0,25 e 0,50 mg CL<sup>-1</sup>  
295 apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle, em *M. spinosa* (Prata)  
296 e *C. cornuta*. Em *M. spinosa* (Duas Unas) houve diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) em  
297 relação ao controle, a partir da concentração 0,08 mg C L<sup>-1</sup> (**Figura 1**).

298 O grau de sensibilidade dos animais às células intactas variou entre as espécies e  
299 aumentou na seguinte ordem: *Ceriodaphnia cornuta* (CL<sub>50</sub> = 0,22 mg C L<sup>-1</sup>), *Macrothrix*  
300 *spinosa* (Duas Unas) (CL<sub>50</sub> = 0,09 mg C L<sup>-1</sup>) e *M. spinosa* (PRATA) (CL<sub>50</sub> = 0,04 mg C L<sup>-1</sup>).

301 *C. cornuta* (tamanho corporal menor, 0,568 ± 0,01 mm) foi exposta a maiores  
302 concentrações de microcistinas nas duas vias de exposição (**Tabela 2**) e foi a menos sensível,  
303 com menor porcentagem de mortalidade em relação aos clones *M. spinosa* (Duas Unas) e *M.*  
304 *spinosa* (Prata), com comprimento médio de 0,960 ± 0,01 e 0,945 ± 0,02 mm, respectivamente  
305 (**Figura 1**).

306 Os valores da menor concentração de efeito adverso observado (LOAEL) em extrato  
307 bruto, foram de duas até oito vezes maiores do que em células intactas (**Tabela 3**). Com isso,  
308 foi possível observar que a porcentagem de morte alcançada nas LAOEL em células intactas  
309 foi a mesma alcançada nas de extrato bruto (**Figura 1**).

310

### 311 *Ensaio de toxicidade crônica*

312 A exposição dos cladóceros a concentrações sub-letais de células de *M. Aeruginosa*  
313 NPLJ-4 promoveu efeitos adversos nos parâmetros populacionais e reprodutivos desses animais  
314 com o aumento das concentrações.

315 As concentrações de carbono do extrato bruto de *Microcystis* foram dez vezes maiores  
316 e microcistinas 5 a 9 vezes mais elevadas comparando com as concentrações de células intactas.  
317 Entretanto, os extratos foram menos tóxicos, sendo observados efeitos crônicos apenas nas  
318 maiores concentrações. As concentrações de microcistinas correspondentes a cada  
319 concentração de carbono utilizadas nas duas vias de exposição são apresentadas na **Tabela 2**.

320 As taxas de crescimento somático dos animais foram reduzidas, apresentando diferenças  
321 significativas entre os tratamentos e controle (*M. spinosa*-F= 81 e *C. cornuta* -F= 50,18, ambos  
322 com  $p < 0,001$ ) (**Figura 3 A e C**). Coincidentemente, a idade da primeira reprodução dos  
323 cladóceros foi adiada entre 1 a 4 dias, com tratamentos significativamente diferentes (*M.*

324 *spinosa*:  $F=79,23$ ; *C. cornuta*:  $F= 41,05$ , ambas com  $p < 0,001$ ) (**Figura 4 A e C**). A  
325 sobrevivência de ambos os clones diminuiu rapidamente na exposição as células intactas de *M.*  
326 *aeruginosa* NPLJ-4. *M. spinosa* e *C. cornuta* apresentaram 70% de sobreviventes no final do  
327 experimento em todas as concentrações (**Figura 2 A e C**).

328 Entretanto, quando expostos ao extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4 os animais  
329 foram menos afetados. *M. spinosa* apresentou 90% de sobreviventes nas concentrações 0,12 e  
330 0,25 mg C L<sup>-1</sup> e o tratamento 0, 50 mg C L<sup>-1</sup> apresentou 70% de sobreviventes no final do  
331 experimento (**Figura 2B**). *C. cornuta* foi menos afetada pelo extrato bruto, com 100% de  
332 sobrevivência no tratamento 0,12 mg C L<sup>-1</sup> e 90% e 80 % de sobreviventes nas concentrações  
333 0,25 e 0,50 mg C L<sup>-1</sup>, respectivamente (**Figura 2 D**). O crescimento somático dos animais não  
334 foi afetado, não havendo diferenças significativas entre as concentrações (*M. spinosa*- $F= 1,011$ ;  
335  $p = 0,401$  e *C. cornuta* - $F = 2,823$ ;  $p > 0,05$ ) em relação ao controle (**Figura 3 B e D**). Na idade  
336 da primeira ninhada foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (*M.*  
337 *spinosa*:  $F=7,2$ ;  $p < 0,001$ ; *C. cornuta*:  $F= 3,645$ ;  $p < 0,05$ ), porém, os animais foram afetados  
338 significativamente somente nas maiores concentrações de extrato bruto. Em *M. spinosa*, apenas  
339 a concentração 0,12 mg C L<sup>-1</sup> não apresentou diferenças significativas em relação ao controle  
340 ( $p = 0, 255$ ). Para *C. cornuta*, apenas o tratamento 0,50 mg C L<sup>-1</sup> apresentou diferença estatística  
341 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Entre os tratamentos não houve diferenças significativas para  
342 os dois animais (**Figura 4 B e D**).

343 A fecundidade média de *M. spinosa* e *C. cornuta* diminuiu em paralelo com o total de  
344 neonatos, e o efeito foi mais acentuado nas maiores concentrações de células intactas, fazendo  
345 desses tratamentos significativamente diferentes do controle ( $p < 0,001$ ). Na comparação entre  
346 os tratamentos, apenas *M. spinosa* apresentou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4 A**  
347 **e C**). O extrato bruto foi menos tóxico, em que a fecundidade média e total de neonatos de *M.*  
348 *spinosa* foram mais afetadas na maior concentração (0,50 mg C L<sup>-1</sup>), com isso, apenas este  
349 tratamento apresentou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle. Para *C.*  
350 *cornuta*, a fecundidade média foi mais afetada no tratamento 0,50 mg C L<sup>-1</sup>, única concentração  
351 que apresentou diferenças significativas em relação ao controle ( $p = 0,001$ ) e no total de  
352 neonatos apenas a concentração 0,12 mg C L<sup>-1</sup> não apresentou diferenças significativas em  
353 relação ao controle ( $p = 0,258$ ) (**Figura 4 B e D**).

354 Os resultados de sobrevivência e fecundidade refletiram na taxa intrínseca de aumento  
355 populacional ( $r$ ) dos dois cladóceros. Na exposição a células intactas o  $r$  foi diminuindo a  
356 medida que as concentrações de células intactas foram aumentando. Todos os tratamentos  
357 apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) (**Figura 5 A e C**). Na



358 exposição ao extrato bruto, *M. spinosa* foi afetada apenas na maior concentração (0,50 mg C L<sup>-1</sup>)  
359 <sup>1</sup>), único tratamento diferente do controle. *C. cornuta* foi a mais afetada pelo extrato bruto, onde  
360 o controle foi diferente de todos os tratamentos e as concentrações 0, 25 e 0,50 mg C L<sup>-1</sup>  
361 apresentaram maior redução de *r*, não havendo diferenças estatísticas entre ambas ( $p = 0,094$ )  
362 **(Figura 5 B e D).**

363

## 364 DISCUSSÃO

365 A literatura reporta que cladóceros são filtradores generalistas, o que é vantajoso quando  
366 o fitoplâncton é nutritivo, porém, durante florações o alimento de boa qualidade é reduzido,  
367 com isso, este grupo é prejudicado, na presença de cianobactérias, por não serem capazes de  
368 selecionar seu alimento, fazendo maior ingestão de células tóxicas [24].

369

### 370 *Ensaio de toxicidade aguda*

371 A maior porcentagem de mortalidade dos clones de cladóceros estudados quando  
372 expostos a células intactas, mesmo em menores concentrações de microcistinas, ocorre pelo  
373 fato da absorção de toxina pelo trato digestivo através da ingestão de células ser mais eficiente  
374 do que a absorção de toxina dissolvida por via dérmica, pois estes animais possuem um  
375 exoesqueleto quitinoso, que dificulta a absorção dessas toxinas [33,38]. Rohrlack et al. [69]  
376 descreveram a absorção de microcistina através do intestino, cujas células de *Microcystis*  
377 ingeridas por *Daphnia* se acumulam e são lisadas pelas enzimas digestivas do intestino,  
378 causando liberação de microcistinas e criando espaços intercelulares, que por sua vez permite  
379 o transporte rápido de altas concentrações de toxinas para o sangue.

380 Além disso, dado que as microcistinas são encontradas intracelularmente em  
381 aproximadamente 95% do tempo durante a floração [40,56], é comum que os organismos  
382 aquáticos sejam expostos a baixos níveis de cianotoxinas dissolvidas no ambiente natural. Com  
383 isso, a via de exposição mais preocupante para as espécies aquáticas é através de células  
384 ingeridas [57], onde as concentrações de microcistinas são mais elevadas [11].

385 A baixa toxicidade dos extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, com aumento  
386 significativo da mortalidade dos animais observada somente nas maiores concentrações, pode  
387 estar relacionada com a diluição das microcistinas, pois em águas naturais mesmo com o  
388 aumento da concentração de microcistina extracelular durante a senescência da floração, estas  
389 toxinas quando diluídas em água, apresentam-se em baixas concentrações (<10µg L<sup>-1</sup>) [22, 58].  
390 Outras razões para isso é que as microcistinas podem ser eliminadas da água, através de sua

391 adsorção no sedimento [59], bem como, pelo processo de fotólise [60] e degradação microbiana  
392 [61].

393 Além disso, a cepa utilizada em nosso estudo é produtora apenas de variantes de MC-  
394 LR, o que pode resultar em menor grau de toxicidade nos ensaios com extrato bruto, devido sua  
395 maior hidrofiliçidade [62]. Moléculas hidrofílicas apresentam pouca capacidade de ultrapassar  
396 membranas lipídicas, necessitando de um mecanismo de transporte para penetrar na membrana  
397 plasmática de células animais. Assim, a presença de aminoácidos com diferentes polaridades  
398 nas moléculas de microcistinas resultam em diferentes graus de toxicidade [63].

399 A menor sensibilidade de *C. cornuta* quando exposta a *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4  
400 está relacionada com características como alta resistência a fome, lento crescimento corporal e  
401 baixa taxa populacional, consideradas vantagens para este clone na presença de cianobactérias  
402 [64]. Além disso, cladóceros de tamanho corporal maior são prejudicados em corpos d'água  
403 com florações, pela sua grande abertura de carapaça que permite a entrada de cianobactérias,  
404 o que interfere a câmara de filtração, devido a inibição dos movimentos de apêndices torácicos.  
405 Em espécies menores, a abertura da carapaça é muito pequena para penetração de cianobactérias  
406 [65], o que os torna menos suscetíveis aos efeitos nocivos das cianobactérias [66]. Estes fatores,  
407 explicam porque *Daphnia* é substituído geralmente por cladóceros pequenos em florações de  
408 cianobactérias em lagos eutróficos e por que muitas vezes uma elevada biomassa de  
409 zooplâncton de corpo pequeno pode co-existir na natureza, durante florações tóxicas [24].

410 A mesma porcentagem de mortalidade entre as LOAEL das duas vias de exposição,  
411 evidencia a maior toxicidade de células intactas e mostra que são necessárias concentrações  
412 muito maiores de extrato bruto, do que de células intactas para matar a mesma quantidade de  
413 organismos [33].

414 Diante da maior porcentagem de mortalidade dos animais expostos a células intactas de  
415 *M. aeruginosa*, concluímos que os animais foram mais sensíveis quando expostos a esta via de  
416 exposição.

417

#### 418 *Ensaio de toxicidade crônica*

419 Nos experimentos de dietas mistas, a concentração final de carbono foi igual em todos  
420 os tratamentos, variando apenas entre a proporção de alga verde e cianobactéria. A proporção  
421 da alga verde *A. falcatus* foi maior em todos os tratamentos de células intactas de *M. aeruginosa*,  
422 deste modo os animais não foram submetidos a condições de limitação alimentar, além disso  
423 as concentrações de microcistinas foram menores. Mesmo assim, a sobrevivência, crescimento

424 e reprodução dos cladóceros, foram mais afetados quando submetidos a esta via de exposição  
425 do que quando expostos ao extrato bruto.

426 Os efeitos crônicos sob os cladóceros expostos às células intactas de *M. aeruginosa*  
427 observados já nas menores concentrações, reforçam a hipótese de que os cladóceros são mais  
428 sensíveis a esta via de exposição. Os efeitos são mais significativos quando os animais são  
429 expostos às células vivas, mesmo em baixas concentrações, do que quando expostos aos  
430 extratos ou toxinas purificadas [57].

431 As reduções da sobrevivência, crescimento e reprodução dos cladóceros observadas  
432 com o aumento das concentrações de células intactas de *Microcystis aeruginosa* mostram um  
433 efeito de dose-reposta. A maior proporção de alimento nutritivo em dieta mista com  
434 cianobactérias, descarta a hipótese de deficiência nutricional e evidencia o efeito tóxico de  
435 *Microcystis aeruginosa* sobre os animais [29].

436 A disponibilidade suficiente de alimento nutritivo associado com a baixa toxicidade do  
437 extrato bruto, foram fatores responsáveis por este não apresentar efeitos adversos no  
438 crescimento somático dos cladóceros em todos os tratamentos. Neste trabalho, chegou-se as  
439 mesmas conclusões de Abreu e Ferrão-Filho [33] e isso dá, provavelmente, pelo fato das toxinas  
440 serem mais dificilmente absorvidas do meio aquoso pela via dérmica, sendo mais  
441 eficientemente absorvidas no trato digestivo, após ingeridas com as células intactas. E ainda  
442 verificaram um estímulo no crescimento corporal dos animais na menor concentração de extrato  
443 bruto de *Anabaena spiroides* produtora anatoxina- a (s), associando isso a uma resposta  
444 hormética.

445 A fecundidade está diretamente relacionada à oferta e à qualidade do alimento [67].  
446 Diante disso, além da toxicidade mesmo em menores concentrações de células intactas, o baixo  
447 valor nutricional ofertado por *Microcystis*, talvez tenha sido insuficiente para suprir a  
448 quantidade de energia necessária para reproduzirem, pois, cianobactérias apresentam baixo  
449 valor nutritivo para o zooplâncton, pois as mesmas são pobres em esteróis e ácidos graxos  
450 polinsaturados que são necessários para seu crescimento e reprodução [68]. Entretanto, na  
451 exposição ao extrato bruto, os efeitos crônicos foram menos significativos e os animais  
452 apresentaram maior desempenho, isso pode ser explicado pela baixa toxicidade dos extratos e  
453 adição de alimento de alto valor nutricional aos tratamentos.

454 Ambos os cladóceros tiveram seu crescimento e reprodução reduzidos na exposição à  
455 células intactas de NPLJ-4, paralelo a isso a taxa de crescimento da população ( $r$ ) foi  
456 diminuindo à medida que a proporção de *Microcystis* na dieta aumentou. Dietas mistas com  
457 concentrações subletais de células de *M. aeruginosa*, podem causar redução da população dos

458 cladóceros [64]. Uma vez que não é oferecida energia suficiente para esses cladóceros ou até  
459 mesmo estes sejam prejudicados pela toxicidade da cianobactéria, a sobrevivência destes  
460 animais é afetada e os que sobrevivem apresentam crescimento corporal lento, atrasando sua  
461 reprodução e afetando a taxa de crescimento populacional.

462 Além da via de exposição, os fatores nutricionais e morfológicos dificilmente podem  
463 ser separados dos efeitos tóxicos, uma vez que esses fatores também podem ser responsáveis  
464 pelo baixo desempenho dos cladóceros [38], pois as cianobactérias são consideradas um  
465 alimento de baixa qualidade para o zooplâncton [24] e os efeitos das florações de *Microcystis*  
466 em cladóceros e outras espécies de zooplâncton dependerão do tamanho da cianobactéria e das  
467 espécies do zooplâncton estudada [29]. Para evitar o efeito da morfologia [29,43], foi utilizada  
468 neste trabalho, cepa unicelular de *Microcystis*.

469

## 470 **CONCLUSÃO**

471 Nossos resultados suportam a hipótese de que a absorção de microcistinas através da  
472 ingestão de células intactas é mais eficaz, uma vez que a toxicidade de microcistinas nos  
473 animais variou em função da via de exposição, onde os cladóceros foram mais sensíveis quando  
474 expostos a células intactas.

475 Com este estudo concluímos, que a via de exposição é um fator determinante nos efeitos  
476 tóxicos de cianobactérias, em que foi observado que os animais foram mais sensíveis sob  
477 concentrações subletais de células intactas de *M. aeruginosa* em dietas mistas.

478 Relacionando nossos resultados ao que ocorre no ambiente aquático natural, ao decorrer  
479 de uma floração, as espécies de cladóceros estão expostos a toxinas intracelulares e  
480 extracelulares. Com isso, pode haver uma variação na sensibilidade desses animais no início e  
481 final das florações, que poderá afetar a estrutura da comunidade zooplanctônica e interferir ao  
482 longo da cadeia trófica.

483

484

485

486

487

488

489

490

491

**492 AGRADecIMENTOS**

493 À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela bolsa  
494 concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
495 Tecnológico (CNPq) Processo: 304237/2015-9 por Grant para a última autora.

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526 **REFERÊNCIAS**

- 527 1. Mohamed ZA, Mohamed AD, Mohamed IAD, Ahmad, KES, Wesam MER. 2015.  
528 Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile  
529 River, Egypt: implication for water treatment and human health. *Environ Sci Pollut Res*,  
530 22:11716–11727.
- 531 2. Paerl, HW, Otten, T G. 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and  
532 Controls. *Microb. Ecol.* DOI 10.1007/s00248-012-0159-y.
- 533 3. Lago, L, Barca, S, Vieira-Lanero, R.; Cobo, F. 2015. Características ambientales,  
534 composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse  
535 de As Forcadas (Galicia, NW España). *Limnetica*, 34 (1): 187-204.
- 536 4. Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA. 2013. Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and  
537 evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:23–43.
- 538 5. Apeldoorn, ME, Egmond, HP, Speijers, GJA, Bakker, GJI. 2007. Toxins of cyanobacteria.  
539 *Molecular Nutrition & Food Research*, 51:7- 60.
- 540 6. Molica R, Azevedo S. 2009. Ecofisiologia De Cianobactérias Produtoras De Cianotoxinas.  
541 *Oecologia Aust.* 13:229–246.
- 542 7. Bittencourt-Oliveira MC, Hereman TC, Cordeiro-Araújo MK, Macedo-Silva I, Dias CT,  
543 Sasaki FFC, Moura NA. 2014. Phytotoxicity associated to microcystins: a review.  
544 *Braz. J. Biol.*, vol. 74, no. 4, p. 753-760.
- 545 8. Puddick J, Prinsep MR, Wood SA, Kaufononga SAF, Cary SC, Hamilton DP. 2014. High  
546 levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and  
547 characterization of six new microcystin congeners. *Marine Drugs*, 12, 5372-5395.
- 548 9. Puddick J, Prinsep MR, Wood SA, Cary SC, Hamilton DP, Holland PT. 2015. Further  
549 characterization of glycine-containing microcystins from the McMurdo Dry Valleys of  
550 Antarctica. *Toxins*, 7, 493-515.
- 551 10. Qi Y, Rosso L, Sedan D, Giannuzzi L, Andrinolo D, Volmer DA. 2015. Seven new  
552 microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain – unambiguous  
553 assignment of product ions by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*,  
554 29, 220–224. DOI: 10.1002/rcm.7098

- 555 11. Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari, E. 2017.  
556 Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human  
557 health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.*
- 558 12. Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR,  
559 Eaglesham GK. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in  
560 Caruaru - Brazil. *Toxicology*. 181–182:441–446.
- 561 13. Žegura B, Štraser A, Filipič M. 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of  
562 cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res.* 727:16–41.
- 563 14. Chatziefthimiou AD, Richer RA, Rowles H, Powell JT, Metcalf JS. 2014. Cyanotoxins as  
564 a potential cause of dog poisonings in desert environments. *Veterinary Record*, 174: 484-485,  
565 doi: 10.1136/vr.g3176.
- 566 15. Carvalho GMC, Oliveira VR, Casquilho NV, Araujo ACP, Soares R M, Azevedo SMFO,  
567 Pires KMP, Valença SS, Zin WA. 2016. Pulmonary and hepatic injury after sub-chronic  
568 exposure to sublethal doses of microcystin-LR. *Toxicon* 112, 51-58.
- 569 16. Rojo C, Segura M, Cortés F, Rodrigo MA. 2013. Allelopathic effects of microcystin-LR  
570 on the germination, growth and metabolism of five charophyte species and a submerged  
571 angiosperm. *Aquatic Toxicology* 144– 145, 1– 10.
- 572 17. Romero-Oliva CS, Contardo-Jara V, Block T, Pflugmacher S. 2014. Accumulation of  
573 microcystin congeners in different aquatic plants and crops - A case study from lake  
574 Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102:121–128.
- 575 18. Mohamed ZA. 2017. Macrophytes-Cyanobacteria allelopathic interactions and their  
576 implications for water resources management – a review. *Limnologica*  
577 <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.006>.
- 578 19. Huang X, Chen L, Liu W, Qiao Q, Wu K, Wen J, Huang C, Tang R, Zhang X. 2015.  
579 Involvement of oxidative stress and cytoskeletal 1 disruption in 2 microcystin-induced  
580 apoptosis in CIK cells. *Aquatic Toxicology*. DOI:  
581 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.aquatox.2015.05.009>
- 582 20. Chen L, Hu Y, He J, Chen J, Giesy JP, Xie P. 2016. Responses of the proteome and  
583 metabolome in livers of zebrafish exposed chronically to environmentally relevant

- 584 concentrations of microcystin-LR. *Environmental Science & Technology*. DOI:  
585 10.1021/acs.est.6b03990.
- 586 21. Qiao Q, Manach SL, Huet H, Berthet ED, Chaouch S, Duval C, Sotton B, Ponger L,  
587 Marie A, Matheron L, Lennon S, Bolbach G, Djediat C, Bernard C, Edery M, Marie, B. 2016.  
588 An integrated omic analysis of hepatic alteration in medaka fish chronically exposed to  
589 cyanotoxins with possible mechanisms of reproductive toxicity. *Environmental Pollution*,  
590 219, 119-131.
- 591 22. Chen F, Dai X, Shu T, Gulati RD, Liu Z. 2013. Microcystins derived from lysing  
592 *Microcystis* cells do not cause negative effects on crustacean zooplankton in Lake Taihu,  
593 China. *Aquat. Ecol.* 47:379–387.
- 594 23. Ger KA, Panosso R. 2014. The effects of a microcystin-producing and lacking strain of  
595 *Microcystis* on the survival of a widespread tropical copepod (*Notodiaptomus iheringi*).  
596 *Hydrobiologia.* 738:61–73: DOI 10.1007/s10750-014-1915-4.
- 597 24. Ger KA, Urrutia-Cordero P, Frost PC, Hansson LA, Sarnelle O, Wilson AE, Lurling M.  
598 2016. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world.  
599 *Harmful Algae.* 54:128–144
- 600 25. Huang L, Xi Y, Xu X, Wen X. 2012. Responses in population growth and reproduction of  
601 the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* to microcystin-LR at different temperatures.  
602 *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 48, 383–390, DOI: 10.1051/limn/2012029.
- 603 26. Zhao S, Wang Y, Li D. 2014. Effects of toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* in  
604 different mixtures with *Scenedesmus obliquus* on growth of *Brachionus calyciflorus*. *Journal*  
605 *of Freshwater Ecology.* 29:3, 377-386, DOI: 10.1080/02705060.2014.895435.
- 606 27. Pérez-Morales A, Sarma SSS, Nandini S. 2014. Feeding and filtration rates of  
607 zooplankton (rotifers and cladocerans) fed toxic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*).  
608 *Journal of Environmental Biology.* 35,1013-1020.
- 609 28. Ferrão-Filho A da S, Kozłowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO. 2002. Accumulation of  
610 microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquat. Toxicol.* 59:201–208.



- 611 29. Ferrão-Filho AS, Azevedo SMFO. 2003. Effects of unicellular and colonial forms of toxic  
612 *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical  
613 cladocerans. *Aquat. Ecol.* 37:23–35.
- 614 30. Cerbin S, Kraak MHS, Voogt P, Visser PM, Donk EV. Combined and single effects of  
615 pesticide carbaryl and toxic *Microcystis aeruginosa* on the life history of *Daphnia pulicaria*.  
616 *Hydrobiologia*, 643:129–138, 2010.
- 617 31. Herrera NA, Echeverri LF, Ferrão-Filho AS. 2015. Effects of phytoplankton extracts  
618 containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans.  
619 *Toxicon.* 95:38–45.
- 620 32. Zagatto PA, Ferrão-Filho AS. 2013 . Acute Effects of a *Cylindrospermopsis Raciborskii*  
621 (Cyanobacteria) Strain on Mouse, *Daphnia* and Fish. *J Ecosyst Ecogr* 3: 121.  
622 doi:10.4172/2157-7625.1000121.
- 623 33. Abreu FQ, Ferrão-Filho AS. 2013. Effects of an Anatoxin-a(s)-Producing Strain of  
624 *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) on the Survivorship and Somatic Growth of Two  
625 *Daphnia similis* Clones. *J. Environ. Prot.* 4:12-18.
- 626 34. Ferrão- Filho AS, Galvão LEC, Magalhães VF. 2014. Differential susceptibility of  
627 cladoceran species to a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*  
628 (cyanobacteria). *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v. 9, n. 1,33-41.
- 629 35. Herrera NA, Palacio J, Echeverri F, Ferrão-Filho A. 2014. Effects of a cyanobacterial bloom  
630 sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. *Toxicology*  
631 *Reports*, 1, 909–914.
- 632 36. Ferrão-Filho AS, Silva DAS, Oliveira TA, Magalhães VF, Pflugmacher S, Silva EM.  
633 2017. Single and combined effects of microcystins and saxitoxins producer cyanobacteria on  
634 the fitness and antioxidant defenses of cladocerans. *Environmental Toxicology and Chemistry*  
635 DOI 10.1002/etc.3819.
- 636 37. Suhett AL, Santangelo JM, Bozelli RL, Steinberg CEW, Farjalla VF. 2015. An overview  
637 of the contribution of studies with cladocerans to environmental stress research. *Acta*  
638 *Limnologica Brasiliensia*, 27(2), 145-159.

- 639 38. Ferrão- Filho AS. 2009. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos  
640 aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 13 (2): 272-312.
- 641 39. Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. 2008. A toxicidade em ambientes  
642 aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*. 31:1820–1830.
- 643 40. EPA- United States Environmental Protection Agency. 2015. Drinking Water Health  
644 Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. Disponível em: Environmental Protection  
645 Agency [cited 2016 December 16]. Available from:;
- 646 41. Graham J, Loftin KA, Meyer MT, Ziegler AC. 2010. Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-  
647 Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environ.*  
648 *Sci. Technol.* 44, 7361–7368
- 649 42. Schwarzenberger A, Elert EV. 2013. Cyanobacterial protease inhibitors lead to maternal  
650 transfer of increased protease gene expression in *Daphnia*. *Oecologia*.172:11–20.
- 651 43. Bednarska A, Pietrzak B , Pijanowska J. 2014. Effect of poor manageability and low  
652 nutritional value of cyanobacteria on *Daphnia magna* life history performance. *J. Plankton*  
653 *Res.* 36(3): 838–847.
- 654 44. Ferrão- Filho AS, Soares MCS.; Lima RS.; Magalhães V. F. 2014c. Effects of  
655 *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia*  
656 (cladocera). *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 33, No. 1, pp. 223–229.
- 657 45. Ferrão-Filho AS, Kozlowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO. 2002. Accumulation of  
658 microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquat. Toxicol.* 59:201-208
- 659 46. Ferreira MFN, Oliveira VM, Oliveira R, Cunha PV, Grisolia CK, Júnior ORP. 2010.  
660 Histopathological effects of [D-Leu1] Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and  
661 intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). *Toxicon*, 55, 1255–  
662 1262.
- 663 47. Gorham PR, Mclachlav JR, Hammer VT, Kim, WK. 1964. Isolation and culture of  
664 toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréd. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew.*  
665 *Limnol.* 15:796-804.

- 666 48. Sun J, Liu D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area  
667 for phytoplankton. *J. Plankton Res.* 25:1331–1346.
- 668 49. Hillebrand H, Dürselen C-D, Kirschtel D, Pollingher U, Zohary T. 1999. Biovolume  
669 calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35:403–424.
- 670 50. Rocha O, Duncan A. 1985. The Relationship between Cell Carbon and Cell-Volume in  
671 Fresh-Water Algal Species Used in Zooplanktonic Studies. *J. Plankton Res.* 7:279–294.
- 672 51. Okumura DT, Sotero-Santos RB, Takenaka RA, Rocha O. 2007. Evaluation of  
673 cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans.  
674 *Ecotoxicology.* 16:263–270.
- 675 52. Fastner J, Flieger I, Neumann U. 1998. Optimised extraction of microcystins from field  
676 samples - A comparison of different solvents and procedures. *Water Res.* 32:3177–3181.
- 677 53. Lawton LA, Edwards C, Codd GA. 1994. Extraction and high-performance liquid  
678 chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters.  
679 *Analyst.* 119:1525–1530.
- 680 54. Taberner A, Castañera P, Silvertre E, Dopazo J. 1993. Estimation of the intrinsic rate of  
681 natural increase and its error by both algebraic and resampling Approaches. *Comput Appl*  
682 *Biosci* 9:535-540.
- 683 55. Hamilton MA, Russo RC, Thurston R V. 1977. Trimmed Spearman Karber method for  
684 estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11:714–  
685 719.
- 686 56. EPA- United States Environmental Protection Agency. Cyanobacteria and cyanotoxins:  
687 Information for drinking water systems. 2014. Disponível em:  
688 [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-8/documents/cyanobacteria\\_factsheet.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-8/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf).  
689 Acessado em : 16/12/2016.
- 690 57. Freitas EC, Printes LB, Rocha O. Acute effects of *Anabaena spiroides* extract and paraoxon-  
691 methyl on freshwater cladocerans from tropical and temperate regions: links between the ChE  
692 activity and survival and its implications for tropical ecotoxicological studies. *Aquatic*  
693 *Toxicology*, 146: 105- 114, 2014.

- 694 58. Koreivienė J, Belous O, Kasperovicienė J. 2013. Variations of microcystins in freshwater  
695 ecosystems. *Bot. Lithuanica*. 19:139–148.
- 696 59. Maghsoudi E, Prevost M, Duy SV, Sauvé S, Dorner S. 2015. Adsorption characteristics of  
697 multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring  
698 and drinking water treatment. *Toxicon*, 103, 48-54.
- 699 60. He X, Cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, O’Shea K, Dionysiou DD. 2015. Destruction of  
700 cyanotoxin microcystins by UV-254 nm based direct photolysis and advanced oxidation  
701 processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction  
702 mechanisms. *Water Research*, doi: 10.1016/j.watres.2015.02.011
- 703 61. Minillo A, Freitas SC, Isique WD, Prado HFA, Dimitrov MR, Paixão DAA, Lemos EGM,  
704 Tangerino EP. 2013. Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu<sup>1</sup>) -microcistina-LR por bactérias  
705 presentes em filtros biológicos de carvão Biodegradation of hepatotoxin (D-Leu<sup>1</sup>) -  
706 microcystin-LR by bacteria in carbon biological filters. *Eng Sanit Ambient*, 18, 3, 205-214.
- 707 62. Ferrão-Filho AS, Herrera NA, Echeverri LF. 2014. Microcystin accumulation in  
708 cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample.  
709 *Toxicon*, 87:26-31.
- 710 63. Vesterkvist PSM, Misiorek JO, Spoo LEM, Toivola DM, Meriluoto JAO. 2012.  
711 Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 Cells.  
712 *Toxins*, 4, 1008-1023.
- 713 64. Ferrão- Filho A S, Azevedo SMFO, DEMOTT WR. 2000. Effects of toxic and non-toxic  
714 cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*,  
715 45, 1–19.
- 716 65. Degans, H. and De Meester, L. 2002. Top-Down Control of Natural Phyto- and  
717 Bacterioplankton Prey Communities by *Daphnia magna* and by the Natural Zooplankton  
718 Community of the Hypereutrophic Lake Blankaart. *Hydrobiologia*, 479, 39-49,  
719 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021002128426>.
- 720 66. Di Genaro AC, Sendacz S, Moraes MAB, Mercante CTJ. 2015. Dynamics of Cladocera  
721 Community in a Tropical Hypereutrophic Environment (Garças Reservoir, São Paulo, Brazil).

722 *Journal of Water Resource and Protection*, **7**, 379-388.

723 <http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2015.75030>.

724 67. Melão MGG. 1999. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos  
725 de águas continentais brasileiras. In Pompêo MLM, ed, *Perspectivas na Limnologia do Brasil*,  
726 União, São Luís, MA, Brazil, pp. 45-58.

727 68. Von Elert, E., Martin-C D, Le Coz, J. R. 2003. Absence of sterols constrains carbon  
728 transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*D. galeata*). *Proc. R. Soc. Lond.*  
729 [*Biol.*], 207, 1209–1214.

730 69. Rohrlack T, Christoffersen K, Dittmann E, Nogueira I, Vasconcelos V, Börner T. 2005.  
731 Ingestion of microcystins by *Daphnia*: Intestinal uptake and toxic effects. *Limnol. Oceanogr.*  
732 50:440–448.

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754 **Figuras**

755 Figura 1: Mortalidade dos cladóceros após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de  
756 células intactas e extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4: A= *M. spinosa* (PRATA), B= *M.*  
757 *spinosa* (DUAS UNAS), C= *C. cornuta* (DUAS UNAS). As diferenças significativas são  
758 indicadas por diferentes letras (teste de Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ). Asteriscos mostram as menores  
759 concentrações de células intactas e as maiores concentrações de extrato bruto que apresentaram  
760 a mesma porcentagem de mortalidade.

761 Figura 2: Sobrevivência das espécies de cladóceros expostas as duas vias de exposição de *M.*  
762 *aeruginosa* NPLJ-4: Células intactas: A- *M. spinosa* e C-*C. cornuta*; Extrato bruto: B-*M.*  
763 *spinosa* e D-*C. cornuta*.

764 Figura 3: Comprimento do corpo das espécies de cladóceros expostas as duas vias de exposição  
765 de *M. aeruginosa* NPLJ-4: Células intactas: A- *M. spinosa* e C-*C. cornuta*; Extrato bruto: B-  
766 *M. spinosa* e D-*C. cornuta*. As diferenças significativas são indicadas por diferentes letras (teste  
767 de Tukey,  $p < 0,05$ ).

768 Figura 4: Idade da primeira reprodução, fecundidade média e total de neonatos das espécies de  
769 cladóceros expostas as duas vias de exposição de *M. aeruginosa* NPLJ-4: Células intactas: A-  
770 *M. spinosa* e C-*C. cornuta*; Extrato bruto: B-*M. spinosa* e D-*C. cornuta*. As diferenças  
771 significativas são indicadas por diferentes letras (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

772 Figura 5: Taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ) das das espécies de cladóceros expostas  
773 as duas vias de exposição de *M. aeruginosa* NPLJ-4: Células intactas: A- *M. spinosa* e C-*C.*  
774 *cornuta*; Extrato bruto: B-*M. spinosa* e D-*C. cornuta*. As diferenças significativas são indicadas  
775 por diferentes letras (teste T pareado,  $p < 0,05$ ).

776

777 **Tabela 1.** ANOVA two-way comparando a mortalidade em *M. spinosa* (Prata), *M. spinosa* (Duas Unas) e *C. cornuta* (Duas Unas), com base nas  
 778 concentrações, vias de exposição e na interação entre esses dois fatores, submetidos a células intactas e extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4.

Cladóceros		df	f	p- valor
	Concentrações	5	34,7	<0,001
<i>M. spinosa</i> (Prata)	Vias de exposição	1	123,6	<0,001
	Concentrações: vias de exposição	5	5,71	<0,001
	Resíduos	36		
	Concentrações	5	125,02	<0,001
<i>M. spinosa</i> (Duas Unas)	Vias de exposição	1	436,36	<0,001
	Concentrações: vias de exposição	5	23,34	<0,001
	Resíduos	36		
	Concentrações	5	49,59	<0,001
<i>C. cornuta</i> (Duas Unas)	Vias de exposição	1	81,72	<0,001
	Concentrações: vias de exposição	5	8,38	<0,001
	Resíduos	36		

779

780 **Tabela 2.** Concentrações de microcistinas correspondente aos tratamentos utilizados nos  
 781 ensaios agudos e crônicos. Nos ensaios crônicos, os valores apresentados são médias  $\pm$  erros  
 782 padrão baseados em cinco medidas durante o experimento (início, meio e fim).

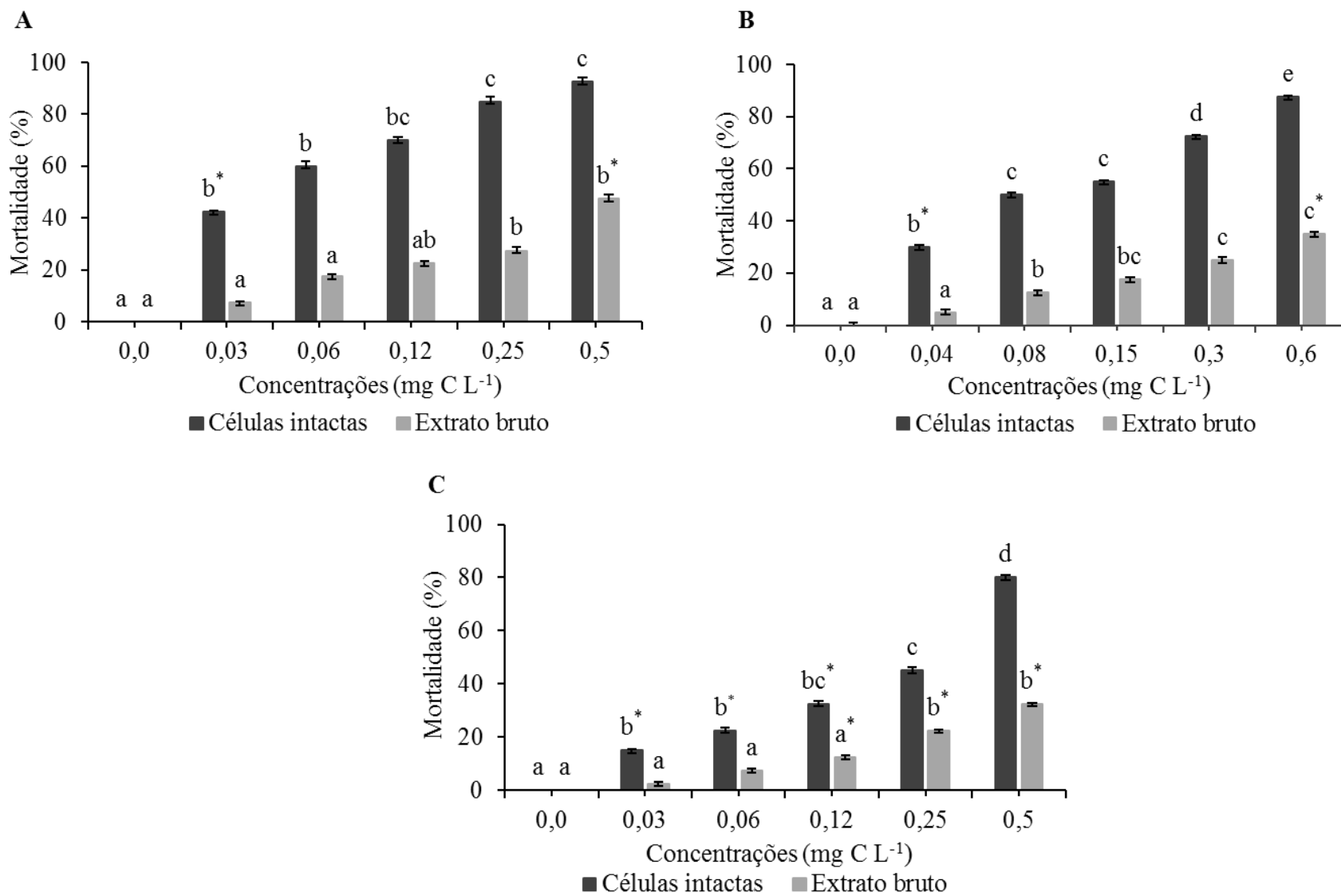
ENSAIO AGUDO		Células intactas		Extrato bruto	
Cladóceros	Concentrações (mg CL <sup>-1</sup> )	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)
<i>M. spinosa</i> (Prata)	Controle	-----	-----		
	0,03	1,5	2,1		
	0,06	3	4,2		
	0,12	6	8,4		
	0,25	12,5	17,5		
	0,50	25	35		
<i>M. spinosa</i> (Duas Unas)	C	-----	-----		
	0,04	2	2,8		
	0,08	4	5,6		
	0,15	7,5	10,5		
	0,30	15	21		
	0,60	30	42		
<i>C. cornuta</i> (Duas Unas)	C	-----	-----		
	0,03	1,8	3		
	0,06	3,6	6		
	0,12	7,2	12		
	0,25	15	25		
	0,50	30	50		
ENSAIO CRÔNICO		Células intactas		Extrato bruto	
	Concentrações (mg CL <sup>-1</sup> )	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)	Concentrações (mg CL <sup>-1</sup> )	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)	Toxina ( $\mu$ g MC/ $\mu$ g C)
<i>M. spinosa</i>	Controle	----	Controle	----	
	0,012	0,6 $\pm$ 0,1	0,12	5,6 $\pm$ 0,5	
	0,025	1,2 $\pm$ 0,1	0,25	11,8 $\pm$ 1,2	
	0,05	2,4 $\pm$ 0,2	0,50	23,6 $\pm$ 2,3	
<i>C. cornuta</i>	Controle	----	Controle	----	
	0,025	1,1 $\pm$ 0,3	0,12	5,3 $\pm$ 1,4	
	0,05	2,2 $\pm$ 0,6	0,25	11 $\pm$ 2,9	
	0,1	4,4 $\pm$ 1,1	0,50	22 $\pm$ 5,7	



784 **Tabela 3.** Concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) em 48 h de exposição estimadas para as espécies de cladóceros expostos a células intactas de *M.*  
 785 *aeruginosa* NPLJ-4 e concentrações de microcistina correspondentes e valores da concentração de efeito adverso baixo observado (LOAEL) em  
 786 células intactas e extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4.

Vias de exposição	Células intactas	Células intactas	Extrato bruto	
Cladóceros	CL <sub>50</sub> -48 horas (IC 95%) (mgCL <sup>-1</sup> )	Toxina (µg MC/ µg C)	LOAEL (mgCL <sup>-1</sup> )	
<i>M. spinosa</i> (Prata)	0.04 (0.02-0.06)	2	0,03	0,25
<i>M. spinosa</i> (Duas Unas)	0.09 (0.06-0.14)	4,5	0,04	0,08
<i>C. cornuta</i> (Duas Unas)	0.22 (0.16-0.29)	13,2	0,03	0,25

787

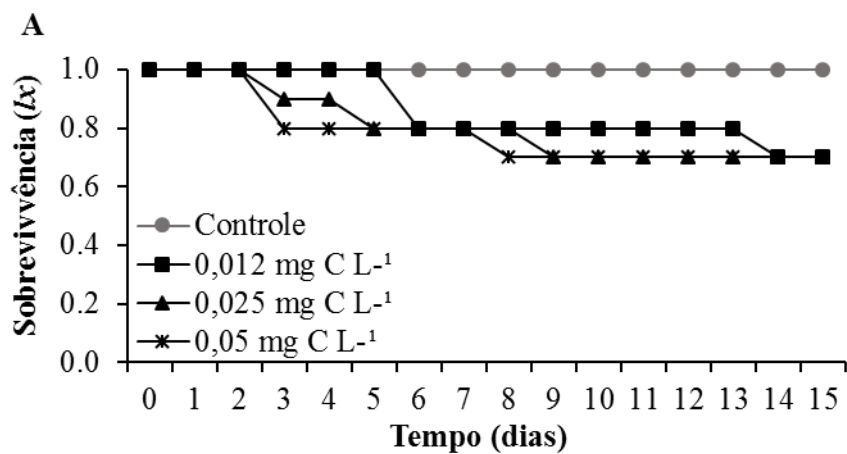


788

789

790 *Figura 1*

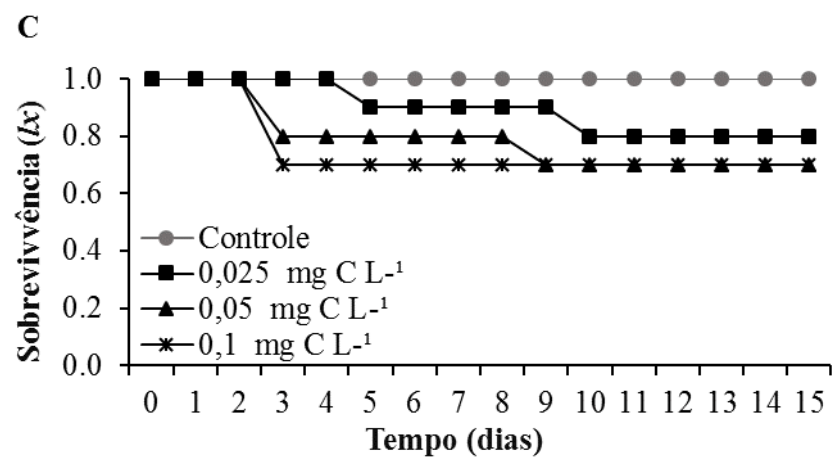
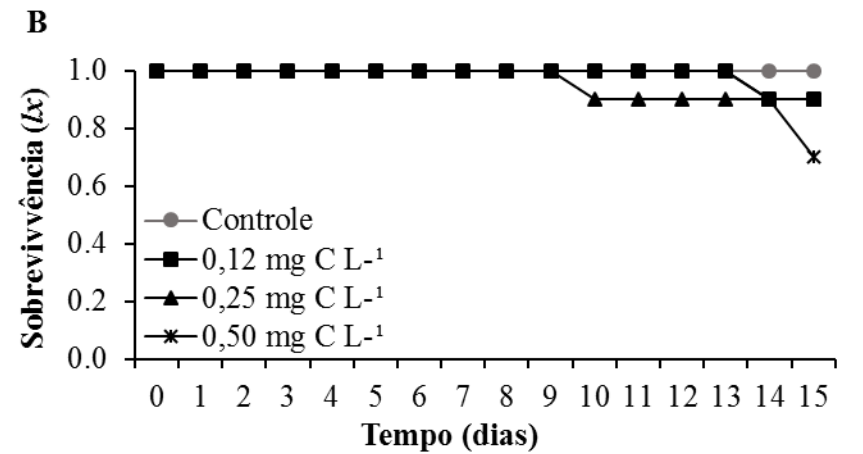
791 CÉLULAS INTACTAS



792

793

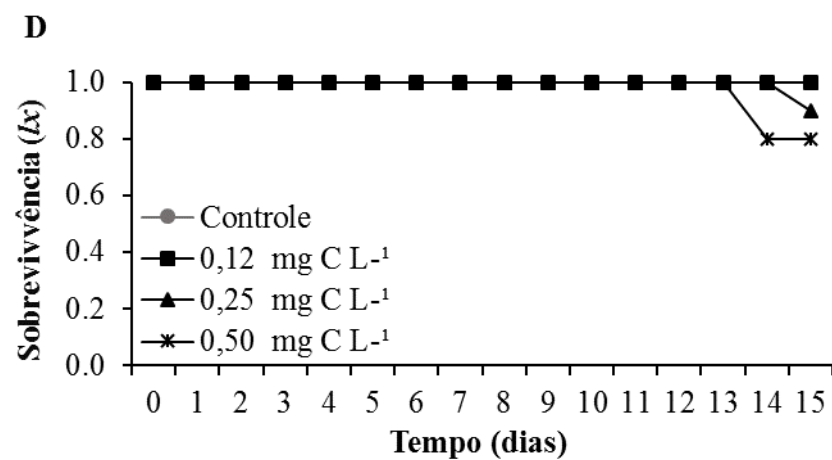
EXTRATO BRUTO



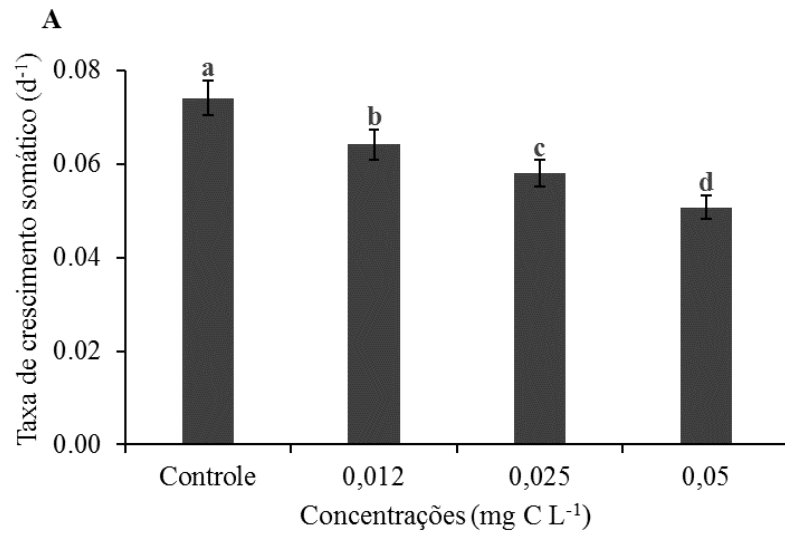
794

795 *Figura 2*

796

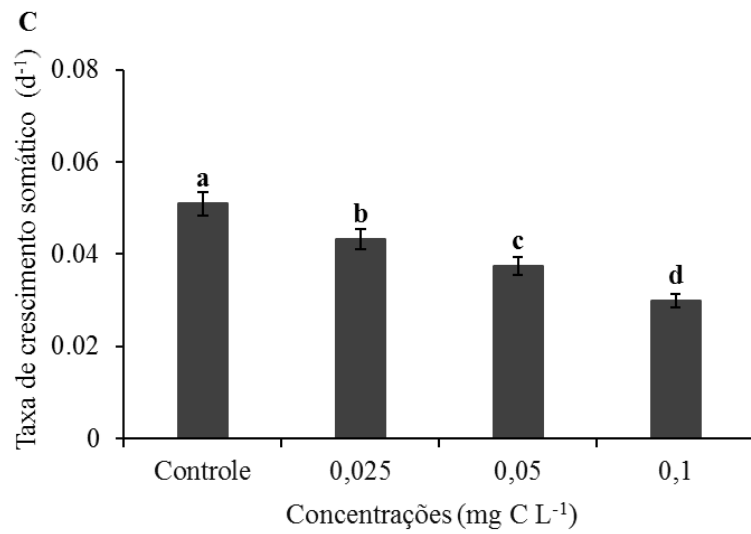
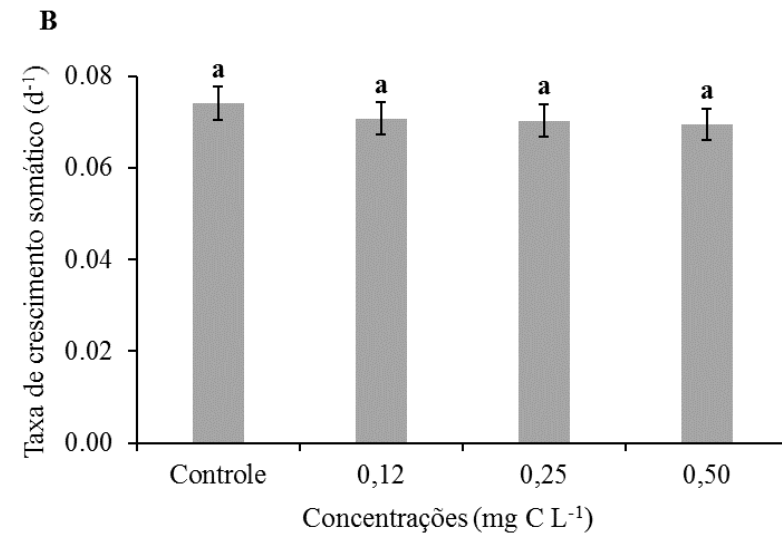


## CÉLULAS INTACTAS

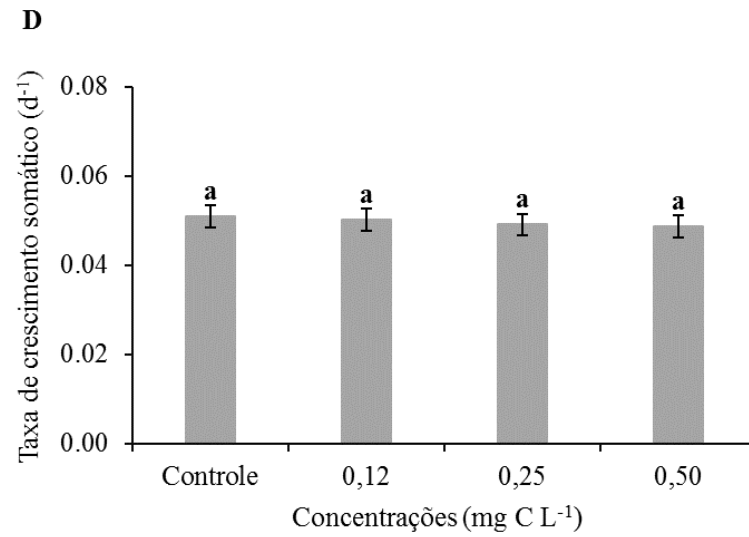


797

## EXTRATO BRUTO

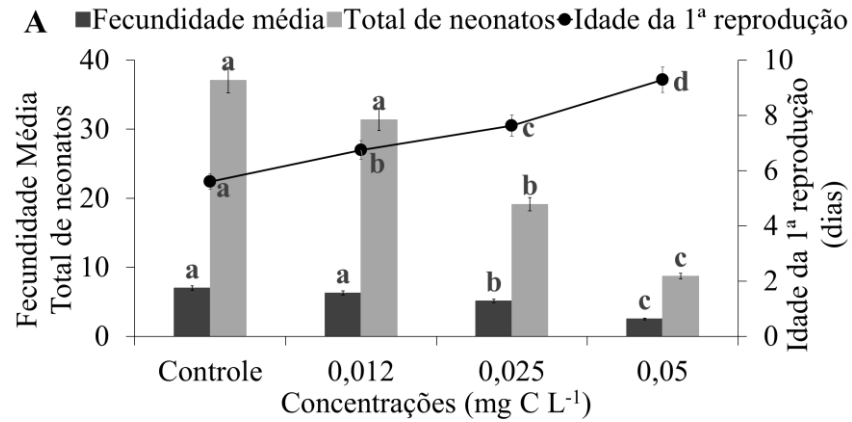


798

799 *Figura 3*

800 CÉLULAS INTACTAS

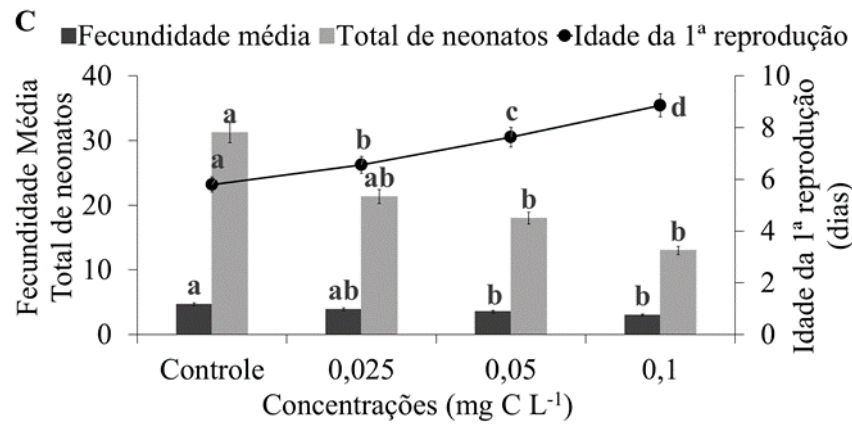
801



802

803

804

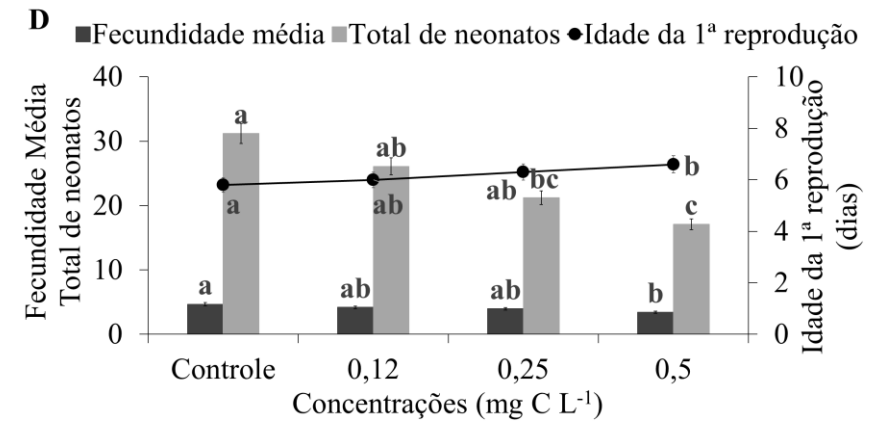
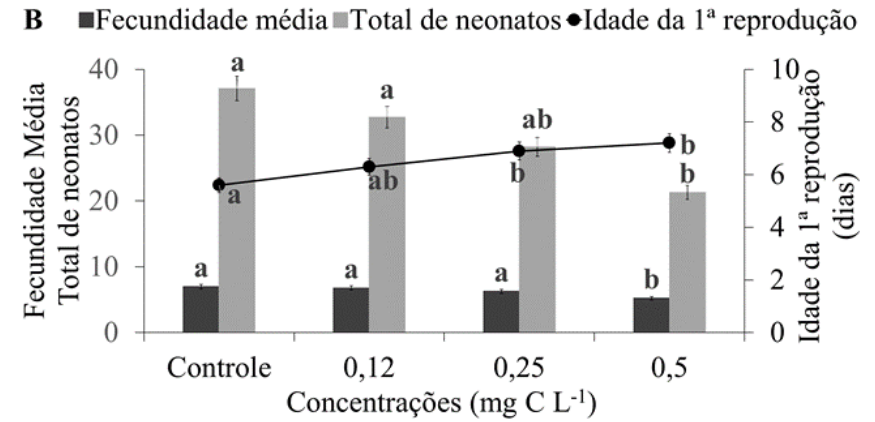


805

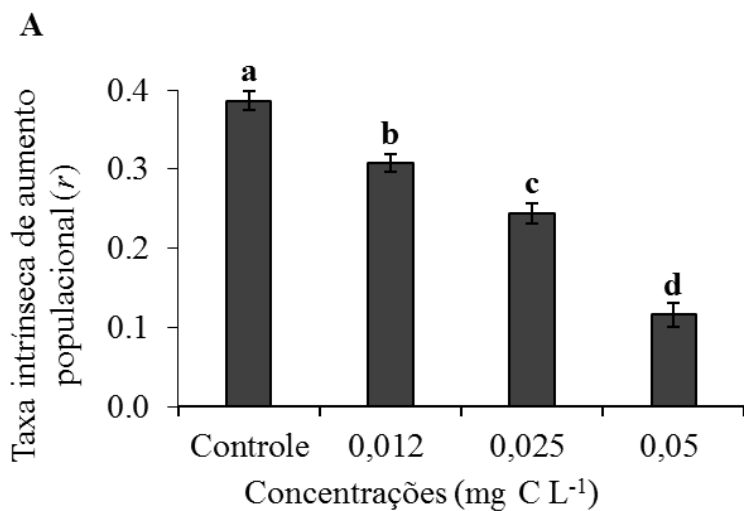
806 *Figura 4*

807

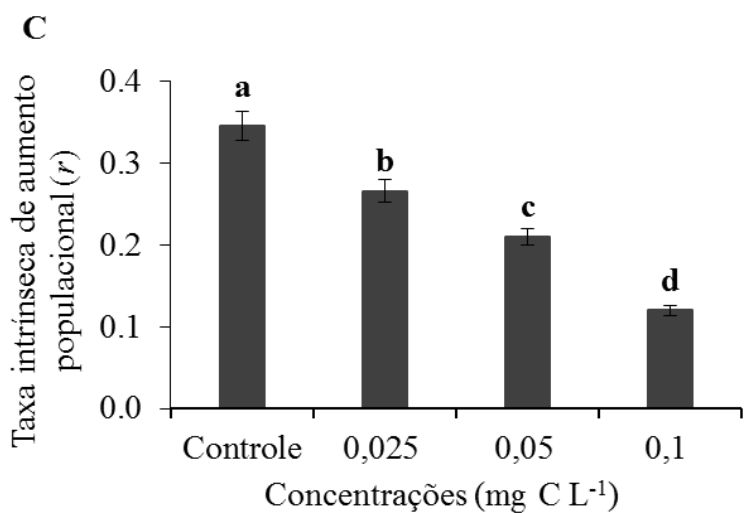
EXTRATO BRUTO



## 808 CÉLULAS INTACTAS



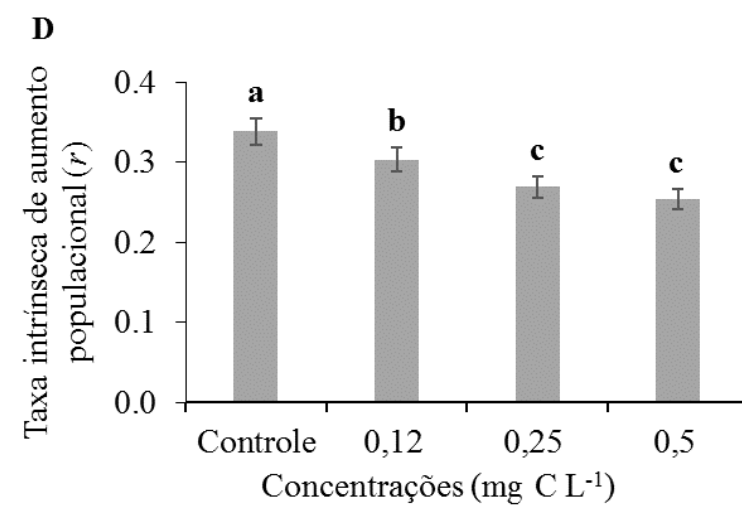
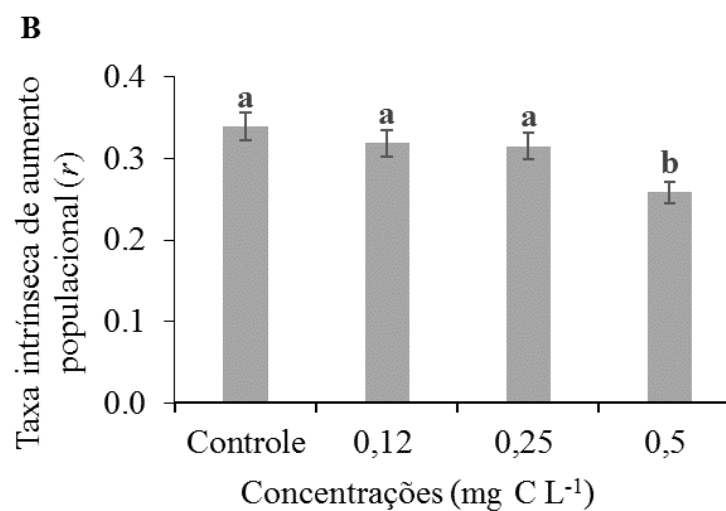
809



810

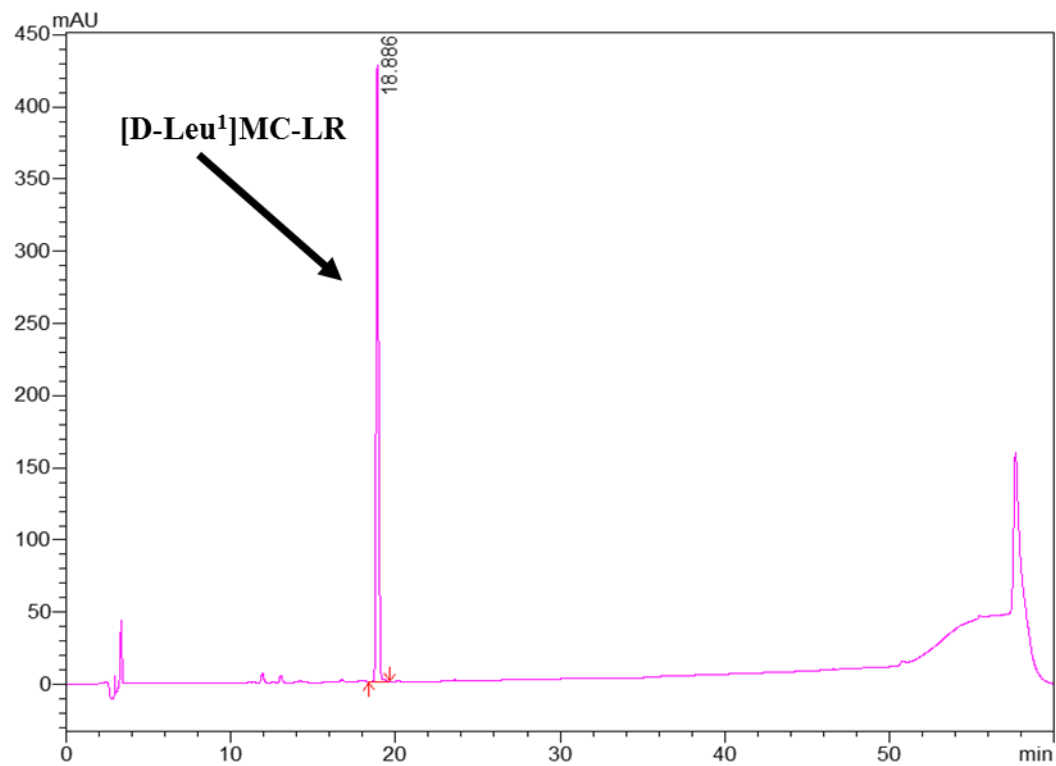
811 *Figura 5*

## EXTRATO BRUTO

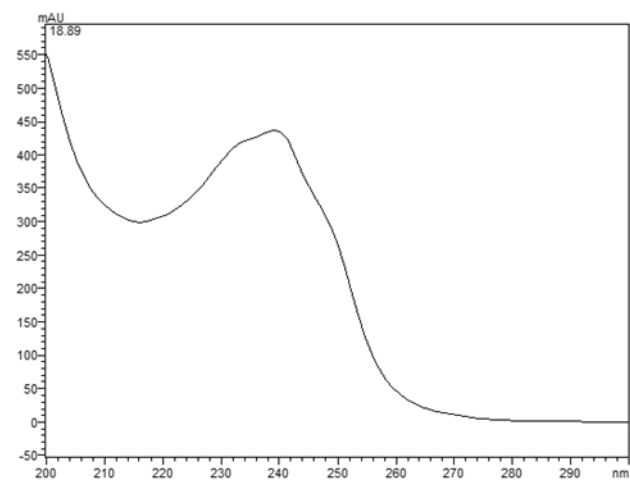


812 **APÊNDICE 1:** Cromatograma (A) e espectro de UV do padrão da microcistinas -LR (B).

**A**



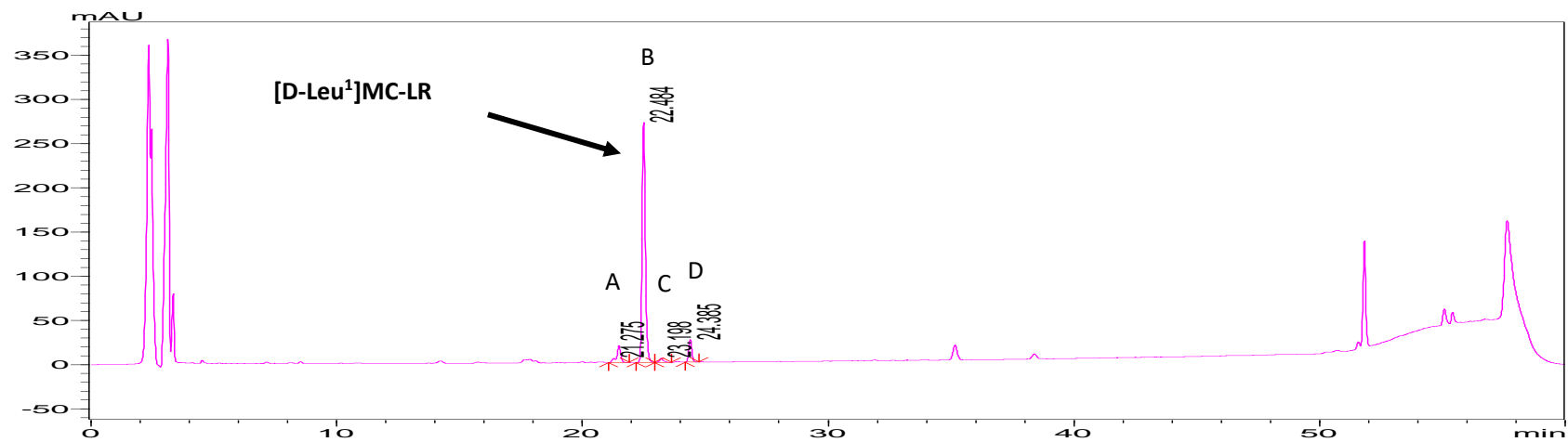
**B**



813

814

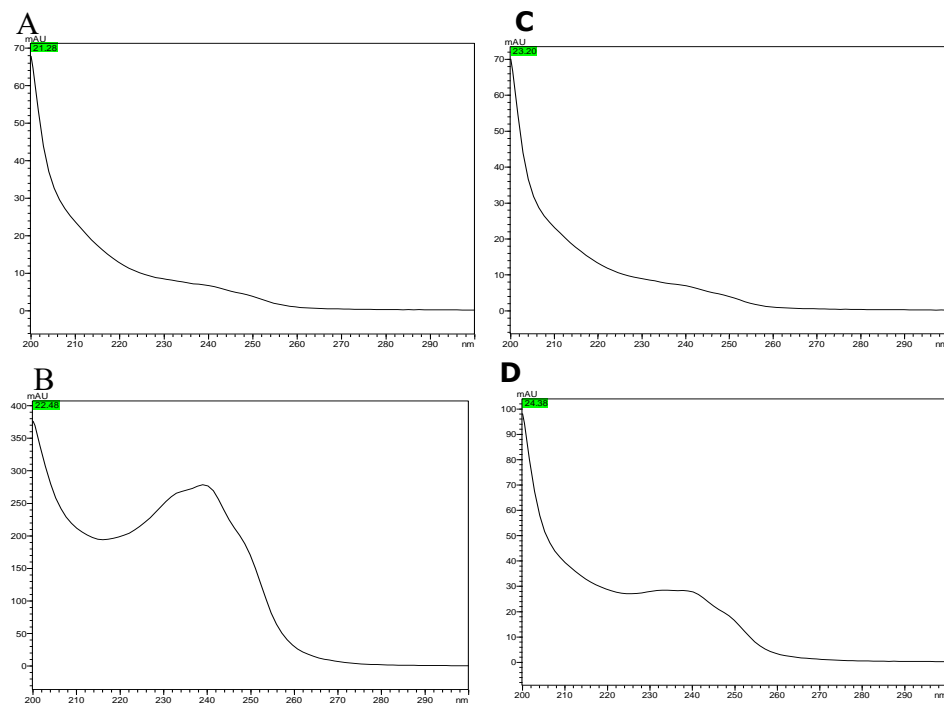
815 **APÊNDICE 2:** Cromatograma e espectros de UV da amostra de *M. aeruginosa* NPLJ4 .



816

817

818





**ANEXO 1: Normas para publicação na *Environmental Toxicology and Chemistry******ET&C Manuscript Preparation: Full Guidelines***

---

Sumário	
How to Use this Guide .....	57
Manuscript Length .....	57
Manuscript Files and Formatting .....	57
File Types .....	58
Formatting .....	58
Manuscript Elements .....	58
Front Matter.....	58
Graphical Abstract.....	59
Main Text.....	59
Back Matter .....	59
References and Citations.....	60
Tables .....	61
Figures.....	62
Additional Data .....	63
ET&C Editorial Style .....	63
General Style .....	63
Abbreviations .....	64
Equations and Mathematical Formulas .....	64
Manufacturer and Trade Names .....	64
Numerals and Units of Measurement.....	65
Powers in Tables and Figures.....	65
Ratios.....	65
Scientific Names .....	66
Soil Classification .....	66
Solutions.....	66
Statistical Treatment.....	66

## How to Use this Guide

---

We understand that formatting a manuscript for submission and publication is a time-consuming process. To simplify the submission process, *ET&C* allows authors to submit the initial version of their manuscript in any form of their choosing, using tips from the [Abbreviated Manuscript Preparation guidelines](#). Authors are welcome to follow the guidelines below for initial submission, but doing so is not mandatory.

If your manuscript is found acceptable pending revisions, please format your revision according to *ET&C*'s full guidelines, found below. We have developed these guidelines\* to aid authors in formatting their revised manuscripts and to improve consistency across articles published in the journal. The guide includes information on document layout, reference styles, and formatting for tables and figures. It also provides clarification and tips regarding numerous style items, such as abbreviations, equations and mathematical terms, and treatment of units of measurement. After acceptance, manuscripts will undergo editorial review for adherence to *ET&C* style. Following the guidelines below can facilitate this process and expedite publication of your manuscript.

Our goal with this guide is to provide authors with a helpful reference to answer formatting and style questions. If you have additional questions, please contact the [ET&C editorial office](#).

## Manuscript Length

---

Although *ET&C* is an online-only journal, authors should strive to keep manuscripts concise. Manuscripts should fall within the following word limits (not including references):

Original Research Paper:  $\leq 8000$  words

Critical Review:  $\leq 10\,000$  words

Short Communication:  $\leq 4400$  words

Letter to the Editor:  $\leq 2200$  words

In the interest of conciseness, please try to limit the reference list to approximately 40 references (more are allowed for Critical Reviews). Please limit the number of tables and figures to 6 each or 12 total.

## Manuscript Files and Formatting

---

## File Types

Submit text, tables, and figures using the file formats listed below.

- Manuscript: Microsoft Word (.doc or .docx), text, or .rtf (no PDFs)
- Graphical Abstract: .doc, .docx, .eps, .jpg, PDF, or .tif
- Tables: .doc, .docx (preferred) or Excel (no PDFs)
- Figure/image files: .doc, .docx, .eps, .jpg, PDF, or .tif
- Supplemental Data can be submitted in a wide variety of file types (.doc, .docx, .eps, .html, .jpg,

\**ET&C's* guidelines are based on *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed. (Council of Science Editors, Reston, VA, USA), with some modifications.

.mov, .mpg, .pdf, .rtf, .tif, .wmv, .xlsx, and zip)

- figshare data can be submitted in a wide variety of file types (see Supplemental Data types)

## Formatting

- Page layout: 8.5-inch × 11-inch paper size, 1-inch margins
- Font: Times New Roman, size 12
- Spacing: Double space and left justify all text, headings, tables, figure legends, and references.
- Headings: Headings and subheadings should be 55 characters or fewer and should be brief phrases or clauses. Format headings as follows:

**HEADING 1: ALL CAPITAL LETTERS, bold font**

Heading 2: Capitalize first word only, *italicize*

Heading 3: Capitalize first word only, *italicize*, run in line with paragraph and end with a period.

- Number the lines of the text continuously from the first page through the figure legends.

## Manuscript Elements

---

### Front Matter

Include the following information as the first page of your main document:

- Running head (60 characters or fewer, including spaces)
- Name and email address of the corresponding author
- Title of article: Be brief and informative, and include terms that will aid in search engine optimization (SEO). Well-known acronyms may be used in the title but should be defined in the abstract.

- List of authors and affiliations
  - Provide authors' complete names.
  - Use superscript lower-case letters to designate authors' affiliations.
    - Affiliations should include the complete names of the institution, along with the city, state/province, and country. The institution listed must be the author's affiliation at the time when research was conducted.
    - Avoid use of acronyms in affiliation names.
    - Place an asterisk after the corresponding author's name.
    - For co-first authors, place a superscript numeral 1 after the affiliation letter for both authors.
- Abstract (maximum of 220 words; 70 words for short communications): Describe the research, results, and conclusions. The abstract contains no citations.
- Keywords (up to 6): Choose terms that will aid in SEO. When submitting a manuscript in Manuscript Central, authors will be required to select 3 keywords from a standard list and will also be able to provide up to 3 additional keywords. The keywords within the manuscript should match the 6 keywords selected in Manuscript Central; however, we understand that they may not match exactly in some instances.
- Corresponding Author note: \*Address correspondence to <author email address>
- Co-first author note (if applicable): <sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

### Graphical Abstract

*ET&C* strongly encourages authors to submit a graphical abstract that provides a visual summary of the main findings of an article. The image should convey the broader importance of the work and capture the reader's attention. When submitting your article in Manuscript Central, include a high-resolution image (larger than 300 dpi at 3 inches/8 cm), along with a brief caption (1–2 sentences).

### Main Text

The main text of your article should include the introduction, materials and methods, results, discussion, and conclusions. The organization of these sections may vary from article to article (e.g., conclusions might be included in the discussion, results and discussion might be presented together), but all should be included in some form.

### Back Matter

Please include the following information after the main text:

- Supplemental data statement (when applicable): *Supplemental Data*—The Supplemental Data are available on the Wiley Online Library at DOI: 10.1002/etc.xxxx
- Acknowledgment (not to exceed 150 words): Please use the *ET&C* preferred spelling (Acknowledgment). When mentioning individuals, use the first initial and last name (i.e., M. Johnson) and do not list titles (e.g., Dr.).
- Disclaimer (when applicable)
- Data availability statement: Explain how readers can access the data and associated metadata and calculation tools. If data are available on figshare (see page 7), the

statement should read: Data pertaining to this manuscript are deposited in figshare at DOI:xxxx.

- Reference list
- Figure captions

### References and Citations

Format references and in-text citations according to the Council of Science Editors (CSE) style, nameyear system. If you are using bibliographic software, select the output style for CSE Style Manual (NameYear). Specific examples of reference types are shown below.

Websites and online databases should be cited as formal references and included in the reference list. Papers that have been accepted for publication may be cited as "in press" and placed in the reference list with a DOI in place of a volume number and page range. Papers still in review may not be cited in the reference list and should instead be listed as unpublished data.

Cite unpublished manuscripts, unpublished data, and personal communications parenthetically in the text only, using the following format: (A.B. Author, University affiliation, City, ST, Country, unpublished manuscript/unpublished data/personal communication). Verify all personal communications with the source, and obtain approval for use of the author's name.

Basic reference style is as follows:

<b>Reference type</b>	<b>Reference format</b> (include all author names; do not use "et al.")
Article or chapter in a book	Author AB, Author CD. 2007. Title of article. In Adams AB, Smith DC, eds, <i>Title of Book</i> , 2nd ed, Vol 1—Toxicology. Publisher, City, ST, Country, pp 1–5.
Journal article <sup>†</sup>	Author AB, Author CD. 2007. Title of article. <i>Abbreviated Title of Journal</i> Vol:Page–page.  Author AB, Author CD. 2007. Title of article. <i>Abbreviated Title of Journal</i> . DOI: 10.1002/etc.XXX.
Journal article accepted and in press (E-pub ahead of print)	Author AB, Author CD. 2007. Title of article. <i>Abbreviated Title of Journal</i> , in press. DOI: 10.1002/etc.XXX.
PhD dissertation or master's thesis	Author AB. 2007. Title of thesis. PhD thesis. University, City, ST, Country.
Proceedings	Author AB, Author CD. 2007. Title of article. <i>Proceedings</i> , Name of Conference, City, ST, Country, date (month day–day, year), pp 1–5.

Report	Author AB. 2007. Title of report. EPA 600/334/778. Final/Technical Report. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
Website	Author AB. 2007. Title of website. City (ST or country): Publisher. [cited YYYY Month Day]. Available from: <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-8618">http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-8618</a>

### Tables

Tables should not duplicate information in the text or data presented in graphic forms and should be able to stand alone without referring back to the text.

Number tables using consecutive Arabic numerals. Do not divide tables into separate parts (for example, Table 1A and 1B). If table parts cannot be combined under one set of column and row headings, renumber the tables using separate numbers (Tables 1 and 2). In the running text, indicate the first mention of each table using red font, and ensure tables and figures are mentioned in numerical order.

Please adhere to these general guidelines when creating tables:

- Tables must have at least 2 columns, and all columns require brief headings that accurately describe all of the entries listed within that column.
- Avoid using bold-face or italicized type within the tables; instead, use lettered notes to explain or differentiate items within the table, as needed.
- Include explanatory matter in the footnotes. Identify footnotes with superscript, lowercase letters (e.g., <sup>a,b</sup>), starting with the title, then upper left column, proceeding to the right across a row, then down to the next row and proceeding again from left to right.

† For abbreviations of journal titles, consult BIOSIS Serial Sources. Sample abbreviations are available online:

[http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/P\\_abrvjt.html](http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/P_abrvjt.html)

- Immediately below the table, provide superscript, lettered footnotes, followed by asterisks for significance (*p* values), then a list of definitions of acronyms used in the table.
- Define all acronyms used in your table; if a lengthy list of acronyms is used in successive tables, define all abbreviations in the first table and then refer back to that table in subsequent tables.
- When using letters to designate significant differences, use full-size (not superscript) capital letters.

Example:

Table X. Table title (short, with no closing punctuation)<sup>a</sup>

Spanner head 1	Spanner head 2
----------------	----------------

Column heading	Column heading	Column heading	Column heading	Column heading	Column heading	Column heading
Sub heading						
Row heading	1.0A	20.5B	40.3B* <sup>c</sup>	X.X*	X.X*	X.X*
Row heading	2.0	2.0	21.7B	XXX	XXX	XXX
Row heading	15.0A	30.5B	15.0	X.X	X.X	X.X

<sup>a</sup> Footnote explaining title or general information about the table. <sup>b</sup> Different letters denote significant differences among treatments. <sup>c</sup> Footnote explaining a data cell nuance.

\*  $p < 0.00$ .

Abbrv = define abbreviation used; Abbrv = define abbreviation used.

### Figures

Figures should not duplicate information in tables or text. Ensure that the figures are clear and can be interpreted without reference to the text. In the running text, indicate the first mention of each figure using red font, and ensure figures are mentioned in numerical order.

Include titles and brief explanatory captions for all illustrations after the reference list in the main document. Define all symbols either in a legend within the figure or in the figure caption. Define all acronyms in the caption. Label multipart figures with consecutive letters of the alphabet (A, B, C, etc.).

Place this letter in the upper left corner of the figure, outside the figure itself.

In addition:

- Ensure that the figure will be legible when reduced to the width of a column of text (3.5 inches).
- Use sentence case (capitalize only the first word) for axis titles, labels, and legends.
- Describe what the error bars mean (SE, SD).
- Avoid textures or shading that will not reproduce well or will not be distinguishable in your legend.
- If the graph is a characterization of correlation, add the coefficient of correlation to the graph.

**Size and Proportion**—When possible, submit figures in the size they are to appear in the journal, using the following guidelines:

- Size: 3.5” width for single-column figure or 7” width for double-column figure • Resolution: At least 300 dpi
- Font (preferred):
  - Arial or Times New Roman ◦ Avoid font smaller than 10 or 12 points

- Ensure numbers and labels in the axes are not larger than the font used for the axis titles
- Avoid boldface type

**Shading and Color**—Half-tones (gray scale) do not reproduce well. Instead, use diagonal and horizontal stripes, checks, and solid black or white bars. If many differences must be presented, a color illustration may be the best alternative. ET&C does not charge a fee for full-color figures.

**Potential Cover Images**—Each cover image is selected by the editor-in-chief and editorial office. Criteria for an appropriate image are size and resolution, style, variety, and space for title placement. Each cover image must represent an article in its designated issue. If you would like a photograph you have taken to be considered for a cover please contact the editorial office at [etc@setac.org](mailto:etc@setac.org).

#### Additional Data

**Supplemental Data**—Material that would appear only in the html version of a manuscript, such as extensive data sets or video files, can be submitted as Supporting Information files. Links to these files will be embedded in the html version of the manuscript. Unlike figshare files, Supporting Information files do not have an assigned DOI and are not uniquely identifiable or citable. Please provide a brief description of Supporting Information contents, to be included in the html version of the manuscript.

**figshare**—ET&C encourages authors to submit their data related to the manuscript to figshare. This is a simple, free, and low-effort service available to all ET&C authors to facilitate submission, deposition, and permanent archiving of data files associated with the manuscript. This service does not replace Supporting Information. If you decide to take advantage of this service, the following will happen, assuming your manuscript is accepted for publication:

- Files submitted as Data Files in Manuscript Central will be permanently deposited into the ET&C figshare repository. Examples are available here.
- These files will inherit metadata from your manuscript, with no effort required on your part.
- Your files on figshare will be assigned a single DOI, making them uniquely identified and citable.
- The link/DOI for your files will be automatically in-lined into your manuscript in the Data Availability statement.

#### ET&C Editorial Style

---

##### General Style

- Submissions must conform to the accepted standards of US English style and usage. Write in simple, declarative sentences.



- Avoid using bulleted or numbered lists within the text.
- When referring to text in another part of the manuscript, include the title of the section or subsection to which you are referring; do not use “below” or “above.”
- Use “the present study” rather than “this study” to refer to your article or study (to avoid confusion with other studies mentioned in the manuscript).
- Do not italicize Latin phrases (et al., in vitro, a priori).
- Use “that is” or “for example” in running text; the corresponding abbreviations (“i.e.” and “e.g.”) may be used within parentheses.

#### Abbreviations

- Use acronyms and abbreviations sparingly to avoid impeding comprehension of the text, and use only those that are well known. For example, abbreviate dissolved organic carbon (DOC) but not Mississippi River.
- Define each acronym at first use in the text, and in each table and figure legend, giving the abbreviation or acronym in parentheses.
- Spell out acronyms when they appear as the first word or phrase in a sentence.
- Format EC50, LC50, or IC50, etc., on line (do not use subscripts).
- Definitions of commonly used symbols and abbreviations can be found here: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-8618/homepage/ETCSymbolsandAbbrevs.pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-8618/homepage/ETCSymbolsandAbbrevs.pdf)

#### Equations and Mathematical Formulas

Simple equations should be written as A/B in line with the text. Longer or more complicated equations should be placed on their own line and numbered, with numbers in parentheses.

- If three or more equations are presented or if an equation is referred to in the text, designate each with a number (1), (2), (3), etc., which is set flush right. Do not include punctuation (period, comma, colon, etc.) to introduce an equation (in the text) or after an equation is presented.
- Ensure all terms in the equation are defined in the text.
- Use italics for  $n$ ,  $p$ ,  $y$ ,  $x$ ,  $t$ ,  $R$ ,  $N$ ,  $F$ ,  $Z$ ,  $df$  (define at first mention),  $k$ ,  $CV$ , and  $r$ .
- Decimals are preferred to fractions. Write out and hyphenate simple fractions (two-thirds), except in figures, graphs, and legends.
- Stack superscripts and subscripts:  $A_1^{!!!}$
- Use the multiplication symbol ( $\times$ ) when referring to multiplication, rather than a product dot ( $\bullet$ ) or an asterisk (\*).

#### Manufacturer and Trade Names

- The names of the manufacturers or suppliers of special material should be given in parenthesis following the product name. Do not include the manufacturer’s location.

- When appropriate, include the copyright, trademark, or registered designation for a product (©, ™, or ®) after the first mention in the abstract, main text, and in each table or figure legend.
- Trade names must be capitalized.
- The use of trade names and code numbers of experimental chemical compounds used in experimentation should be avoided. Identify such compounds by common name (ASA) or by chemical name and structural formula. Lot numbers, purity, impurities, etc., may be appropriate.

#### Numerals and Units of Measurement

- The metric system is standard, and SI units should be used when possible.
- Use numerals for all numbers (including 1 through 9); however, spell out “one” and “zero” when not used in conjunction with a unit of measurement.
- Spell out all numbers or fractions that begin a sentence. If this is awkward, rephrase the sentence to avoid beginning with a numeral.
- Check tabular data, as well as numerical values, reported in the text for the proper number of significant figures. For decimals smaller than one, insert a zero before the decimal point: 0.345.
- Do not use a hyphen to replace the preposition "to" between numerals: 13 to 22 min, 3 to 10 °C. Exception: Use a dash in tables, figures, and graphs, and within parentheses.
- In a list of values or measurements, include the unit of measurement only after the last value in a list or range (example: 0.1, 0.25, 1, and 2.5 mg/L).
- Use the following time measurements: s = second(s); min = minute(s); h = hour(s); d = day(s); wk = week(s); mo = month(s); yr = year(s) when following a numeral
- Capitalize the letter L when used for “liter” (e.g., mL, nL, L).

#### Powers in Tables and Figures

Care is needed in tables and figures to avoid numbers with many digits. The unit should be followed by the power of 10 by which the actual quantity was multiplied to give the reported quantity; the unit may be changed by the use of prefixes such as "mM" or "m." For example, an entry "5" under the heading " $\text{g} \times 10^{-3}$ " means that the value of g is 0.005; and entry "5" under the heading " $\text{g} \times 10^3$ " means that the value of g is 5000. A concentration of 0.0015 M may be expressed as 1.5 under the heading "concn. (mM)" or as 1,500 under the heading "concn. (mM)" or 15 under the heading " $10^{-4} \times \text{concn. (M)}$ ."

#### Ratios

For mixtures, use "to" when general words are used (e.g., "the chloroform to methanol ratio"). Use a colon with words when a numerical ratio is provided (e.g., "chloroform:methanol (2:1,v/v)"). Use a colon with a number ratio. Use a hyphen only if a numerical value is not given (e.g., "chloroform-methanol").

### Scientific Names

On first use in the abstract and main text, and in each table and figure legend, use the complete scientific name (genus, species authority for the binomial, and cultivar or strain), when appropriate, of all experimental organisms. Following this initial citation, the genus name may be abbreviated to the initial. Scientific names (genus and species) should be italicized.

### Soil Classification

Measured values for soil physicochemical characteristics having a bearing on the research must be reported in the manuscript for each individual type of soil used and may be reported in table format. Authors are strongly encouraged, whenever feasible, to give the soil type/name, texture, and scientific classification of each soil. This scientific nomenclature for soils must be consistent with a modern published soil classification system, and the system must be cited.

### Solutions

Fractional concentrations of solutions should be expressed in the decimal system: 0.1 N acetic acid (and not N/10 acetic acid). The term % must be defined as w/w, w/v, or v/v; 10% (w/v) signifies 10 g/100 mL. Express concentrations as ng/L, mg/L, mg/L, ng/g, mg/g, etc.

### Statistical Treatment

When appropriate, statistical analysis should be included. Define all statistical measures clearly.