

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E ECOTOXICOLÓGICAS DE
CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM PEIXES**

DANIELA MOTTA FAILACE

MAIO 2015

Implicações Ecológicas e Ecotoxicológicas de Cianobactérias e Cianotoxinas em Peixes

Daniela Motta Failace

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. David da Motta Marques
Co-Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena Ribeiro Rodrigues

Comissão Examinadora
Prof. Dra. Luciane Oliveira Crossetti
Prof. Dra. Sandra Maria Hartz
Prof. Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Porto Alegre, maio de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço pela oportunidade, disponibilidade, incentivo e a estrutura fornecida pelo meu orientador Prof. David da Motta Marques.

À profa. Lucia Ribeiro Rodrigues, a co-orientação, as conversas, a amizade, incentivos, seu tempo disponibilizado, a atenção, por tudo que de certa forma me fez realizar esta dissertação de mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a profa Sandra Hartz e a secretária Silvana Bartozzo, que sempre proporcionaram a atenção e dedicação.

À Capes e ao CNPQ, pela bolsa e pelo financiamento, tornando um sonho possível.

Agradeço em especial a Bibiana Kaiser Dutra, por todos os anos de convivência, desde a época da iniciação científica, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas contribuições, pela parceria de trabalho. Ajudou e sempre ajuda no meu aprendizado no âmbito científico e pessoal.

Agradeço a minha filha Gabriela Failace Lencina pela paciência e por saber esperar e entender a mãe.

Aos meus avôs, João Motta e Maria Motta, por que sem eles, não teria chegado até aqui.

A uma pessoa chamada Rebeca Barbiani, por não entender nem metade do que faço, e ter paciência de me esperar e suportar minha ausência. E de certa forma, me incentivou a ter mais certeza do que quero e onde pretendo chegar.

À Marla Lima pelos auxílios nos experimentos, pelos ensinamentos dos programas de análise estatística, pelas conversas, pela amizade e pela parceria de trabalho.

A Juliana pela amizade e auxílio.

A Natália pela mãozinha nos experimentos.

A todas as bolsistas de iniciação científica que auxiliaram a realização deste estudo, pela paciência, dedicação e responsabilidade. Espero ter proporcionado a toda uma aprendizagem valorosa a sua carreira, como a Bibiana Dutra me proporcionou.

Aos técnicos do Instituto de Pesquisa Hidráulicas (IPH) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mara Domingues, Tiago Centurião e Louidi Lauer pelos ensinamentos e atendimento, proporcionando o funcionamento de muitas das análises realizadas nesta dissertação.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos ensinamentos e dedicação.

Agradeço a todos e a tudo que proporcionou a realização deste trabalho, atingindo mais objetivo na minha carreira.

RESUMO

Florações de cianobactérias representam grave problema para a qualidade da água de lagos e reservatórios, pela produção de toxinas que podem causar danos a organismos aquáticos e seres humanos. Como implicação, o processo de formação de colônias ou agregados de cianobactérias impede a predação pelo zooplâncton, mas, por outro lado, aumenta a vulnerabilidade das cianobactérias à pressão de herbivoria por peixes filtradores. Estudos experimentais têm quantificado as taxas de ingestão de algas e cianobactérias por *Oreochromis* (tilápia) em laboratório, porém, pouco se sabe sobre interações de espécies de peixes nativos, como do gênero *Geophagus* (cará) com cianobactérias. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram (1) investigar, experimentalmente, medidas de controle natural de cianobactérias através da utilização de peixes filtradores nativos e exóticos; (2) identificar estruturas relacionadas à eficiência de filtração nestes peixes e (3) avaliar mecanismos de dano-reparo enzimático em peixes que tem sua dieta baseada na ingestão de cianobactérias tóxicas, através da relação de enzimas antioxidantes e a ocorrência de estresse oxidativo devido à possibilidade de produção de cianotoxinas. Experimentos foram realizados avaliando as taxas de consumo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. (espécie exótica) e *Geophagus brasiliensis* (espécie nativa). Os tratamentos, em triplicata, incluíram peixes de duas classes de tamanho (Tratamento 1: peixes de 5-10 cm; Tratamento 2: peixes de 10-15 cm); três concentrações de cianobactérias (10µg/L, 20µg/L e 40 µg/L) e controles contendo somente inóculo algáceo nas concentrações 10µg/L, 20µg/L e 40 µg/L. Com o intuito de evidenciar diferenças entre os tratamentos foi realizada análise da variância (ANOVA). Análises morfológicas nas brânquias de exemplares utilizados nos experimentos foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar a existência de estruturas relacionadas à eficiência de filtração nestes peixes. Por fim, para avaliar os efeitos das cianotoxinas nos exemplares utilizados nos experimentos foram realizadas análises bioquímicas de lipoperoxidação (LPO) avaliando o dano oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione-s-transferase (GST) no fígado e nas brânquias dos exemplares. Com o intuito de evidenciar diferenças entre os tratamentos foi realizada análise da variância (ANOVA *one-way*). Para *Oreochromis* sp. frente à ingestão/filtração de *M. aeruginosa*, em todas as concentrações foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Nos organismos-teste do tratamento 1 ocorreu decréscimo nas concentrações de cianobactérias, já nos organismos-teste do tratamento 2 ocorreu aumento das concentrações de cianobactérias ao longo do tempo. Para *Oreochromis* sp. frente à ingestão/filtração de *C. raciborskii*, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas principalmente nas concentrações 10µg/L e 20µg/L quanto à redução das concentrações de cianobactérias ao longo do tempo. No experimento utilizando *G. brasiliensis* frente à ingestão/filtração de *M. aeruginosa*, não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações 10µg/L e 40µg/L, entretanto ocorreu uma diminuição nas concentrações de cianobactérias. Contudo, no experimento avaliando as taxas de ingestão/filtração de *C. raciborskii* por *G. brasiliensis* ocorreu redução na concentração de cianobactérias nas concentrações 10µg/L e 20µg/L em ambos os tratamentos ($p < 0,05$). Resultados das análises morfológicas através de microscópio eletrônico de varredura evidenciaram a existência de micro-espinhos branquiais, tanto em *Oreochromis* sp. quanto em *G. brasiliensis*, validando a possibilidade de *G. brasiliensis* poder ser utilizado como controle natural de cianobactérias. Análises do balanço oxidativo revelaram como padrão geral para ambas as espécies de ciclídeos avaliados, a ocorrência de alterações bioquímicas nas condições testadas. Porém nestas condições-teste (espécies de peixes e de cianobactérias, concentrações das cianobactérias avaliadas e tempo de

experimento) estes danos foram reparados pela ação das enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos neste estudo representam importantes conhecimentos para o manejo e restauração de ecossistemas aquáticos eutrofizados baseado em interações de espécies.

Palavras-chave: Comportamento alimentar, ciclídeos, cianotoxinas, biomarcadores, detoxificação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cyanobacteria blooms represent a serious problem for the quality of water from lakes and reservoirs, the production of toxins to aquatic organisms and humans. As implication, the process of formation of colonies or aggregates of cyanobacteria preventing predation by zooplankton, but on the other hand, increases the vulnerability of the cyanobacteria to filtrating pressure by herbivorous fish. Experimental studies have quantified the ingestion rates of algae and cyanobacteria by *Oreochromis* (tilapia) in the laboratory, however, little is known about interactions of species of native fish such as the genus *Geophagus* (cará) with cyanobacteria. In this sense, the objectives of this study were (1) to investigate experimentally measured natural control of cyanobacteria by using filter-native and exotic fishes, (2) identified structures related to the filtration efficiency in these fishes (3) evaluating mechanisms of damage-repair enzyme in fish that have diet based on their ingestion of toxic cyanobacteria, through the relation antioxidant enzymes activity and the occurrence of oxidative stress. Experiments were conducted to evaluate the consumption rates of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* by *Oreochromis* sp. (exotic species) and *Geophagus brasiliensis* (native species). Were determined treatments in triplicate consisting of fish of two size classes (Treatment 1: fish 5-10 cm; Treatment 2: fish 10-15 cm); three cyanobacterial concentrations (10µg/L, 20µg/L and 40µg/L) and controls containing only algal inoculums concentrations 10µg/L, 20µg/L and 40µg/L. In order to show differences between treatments analysis of variance (ANOVA) was performed. Morphological analysis in the gills of specimens used in the experiments were carried out using scanning electron microscopy (SEM) to verify the existence of the structures related to filtration efficiency in these fishes. To assess the effects of cyanotoxins on the specimens used in the experiments biochemical analyzes were performed in the liver and gill measuring lipoperoxidation (LPO) assessing oxidative damage, and antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione-s-transferase (GST). In order to show differences between treatments analysis of variance (ANOVA) was performed. Designed to evaluate whether the concentrations and the treatments were effective was an analysis of variance ANOVA two-way and in order to highlight differences between treatments was performed analysis of variance ANOVA. Morphological analysis in the gills of samples used in the experiments were performed using scanning electron microscopy (SEM) to verify the existence of related structures to the filtration efficiency in these fish. To assess the effects of cyanotoxins in the animals used in the experiments were performed biochemical analyzes in the liver and gills of lipoperoxidation (LPO) assessing oxidative damage, and the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST). In order to highlight differences between treatments was performed analysis of variance (one-way ANOVA). For *Oreochromis* sp. the intake/filtration of *M. aeruginosa* in all concentrations were significant differences ($p < 0.05$) in test organisms in T1 were decreasing concentrations of the cyanobacteria and the test organisms in T2 was increased concentrations of cyanobacteria over time. In the experiment using *G. brasiliensis* the intake/filtration of *M. aeruginosa*, no significant difference in the concentration 10µg/L and 40µg/L ($p > 0.05$), however there was a decrease in cyanobacteria concentrations. For *Oreochromis* sp. the

intake/filtration of *C. raciborskii*, significant differences were observed mainly in the concentration 10µg/L and 20µg/L and the reduction of cyanobacteria concentrations over time ($p<0.05$). However, in the experiment evaluating the intake/filtration rates of *C. raciborskii* by *G. brasiliensis* occurred reduction in the concentration of cyanobacteria at 10µg/L and 20 µg/L concentrations in both groups ($p<0.05$). Results of morphological analysis using a scanning electron microscope revealed the existence of gill microspine, both in *Oreochromis* sp. as for *G. brasiliensis* validating the possibility of *G. brasiliensis* can be used as natural control of cyanobacteria. The analyzes realized in the oxidative balance of the test organisms based diet ingestion of toxic cyanobacteria revealed, as a general standard for both cichlid species evaluated, the occurrence of biochemical changes in the conditions used, but considering these test conditions (fish species, cyanobacteria species, concentrations of cyanobacteria and time trial) such damages were repaired by the action of antioxidant enzymes. These results are important for knowledge management and restoration of eutrophic aquatic ecosystems based on species interactions.

Key-words: Feeding behavior, *Oreochromis* sp, *Geophagus brasiliensis*, cyanotoxins, biomarkers, detoxification, oxidative stress.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
APRESENTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1 CIANOBACTÉRIAS E QUALIDADE DA ÁGUA	2
1.1.1 Pressão de herbivoria por peixes	3
1.2 TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS E ESTRESSE OXIDATIVO..	4
1.2.1. Controles biológicos	5
2. OBJETIVOS	6
3. HIPÓTESES	6
4. CAPÍTULO 1: Avaliação experimental das taxas de consumo de cianobactérias por peixes ciclídeos	7
5. CAPÍTULO 2: Avaliação do balanço oxidativo em ciclídeos com potencial para controle de cianobactérias	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1. Valores de significância para o teste de hipótese, referente à análise de eficiência de consumo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* pela espécie de peixe exótica *Oreochromis* sp. (tilápia) e pelo peixe nativo *Geophagus brasiliensis* (cará) em experimentos de 96 horas de duração, com determinação da concentração de cianobactérias a cada 24 horas. Cada experimento compreendeu três módulos em triplicata: peixes pequenos (entre 5 e 10cm); peixes grandes (entre 10 e 15cm) e controle (sem peixes). Cada módulo contou com duas concentrações iniciais de cianobactérias; 20 e 40µg/L 18

Tabela 2. Valores de significância para teste o de hipótese, referente à análise de eficiência de consumo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* pela espécie de peixe exótica *Oreochromis* sp. (tilápia) e pelo peixe nativo *Geophagus brasiliensis* (cará) em experimentos de 96 horas de duração, com determinação da concentração de cianobactérias a cada 24 horas. Cada experimento compreendeu três módulos em triplicata: peixes pequenos (entre 5 e 10cm); peixes grandes (entre 10 e 15cm) e controle (sem peixes). Cada módulo contou com duas concentrações iniciais de cianobactérias; 20 e 40µg/L 19

CAPITULO 2:

Tabela 1: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) no fígado de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Microcistys aeruginosa*. 38

Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Microcistys aeruginosa*. 39

Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) no fígado de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Cylindrospermopsis raciborskii*. 42

Tabela 4: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Cylindrospermopsis raciborskii* 43

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1:

- Figura 1.** Concentração de *Microcystis aeruginosa* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Oreochromis* sp. 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Oreochromis* sp. 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *M. aeruginosa* 13
- Figura 2.** Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Oreochromis* sp. 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Oreochromis* sp. 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *C. raciborskii* 14
- Figura 3.** Concentração de *Microcystis aeruginosa* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Geophagus brasiliensis* 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Geophagus brasiliensis* 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *M. aeruginosa* 15
- Figura 4.** Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Geophagus brasiliensis* 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Geophagus brasiliensis* 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *C. raciborskii* 16
- Figura 5.** Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* em aquários com *Oreochromis* sp. (tilápia) com tamanhos entre 5 e 10 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas 20
- Figura 6.** Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* em aquários com *Geophagus brasiliensis* (cará) com tamanhos entre 5 e 15 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas 20
- Figura 7.** Concentração de *Microcystis aeruginosa* em aquários com *Oreochromis* sp. (tilápia) com tamanhos entre 5 e 10 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas 21
- Figura 8.** (A) Elétron-micrografia de varredura da brânquia de *Oreochromis* sp. (a) Rastro branquial; (b) arco branquial; (c) filamento branquial; (d) micro-espinho branquial; (B) Elétron-micrografia de varredura da brânquia de *Geophagus brasiliensis*. (a) Rastro branquial; (b) arco branquial; (c) filamento branquial; (d) micro-espinho branquial 22

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Professor David da Motta Marques e co-orientação da Professora Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues.

A dissertação está organizada a partir de uma introdução geral e em seguida divide-se em dois capítulos em formato de artigos. No primeiro capítulo foi avaliado experimentalmente as taxas de consumo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*, formatado de acordo com as normas do periódico *Toxins*. No segundo capítulo foi avaliada a ocorrência de estresse oxidativo em *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* quando submetidos a uma dieta baseadas na ingestão das cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, através da análise dos níveis de lipoperoxidação e atividade de enzimas antioxidantes, formatado de acordo com as normas do periódico *Ecotoxicology*. A dissertação é finalizada com as considerações finais, que ressaltam as principais conclusões do estudo.

Os experimentos realizados neste estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Ecotecnologia e Limnologia do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH/UFRGS), que dispõe de um banco de cultura de cepas tóxicas das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (NPLJ4) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3). Estas cepas foram utilizadas como inóculo nos experimentos realizados. Os exemplares de *Oreochromis* sp. utilizados neste estudo foram obtidos do criatório Águas da Olaria em Dois Irmãos, RS, Brasil; e os exemplares de *Geophagus brasiliensis* foram coletados na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS). Os experimentos foram realizados de acordo com padrões éticos de utilização de animais e integram os projetos “Validação da eficiência de medidas naturais para controle de florações de cianobactérias através de modelagem ecológica” e “Estresse oxidativo de cianotoxinas em peixes: implicações ecológicas”, ambos registrados na plataforma de pesquisa da UFRGS, registrados sob números 23029 e 25505, respectivamente, sob coordenação da prof^a Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CIANOBACTÉRIAS E QUALIDADE DA ÁGUA

Uma das principais modificações provocadas pelo homem em ambientes aquáticos é a eutrofização, causada geralmente pelo aporte excessivo de nutrientes, especialmente relacionado às descargas de efluentes domésticos e industriais dos centros urbanos e regiões agrícolas. (Gélinas et al., 2012). Como conseqüências da eutrofização, ocorre o crescimento acelerado do fitoplâncton, principalmente das cianobactérias, desencadeando a formação de florações.

Florações de cianobactérias representam um problema para a qualidade da água de lagos e reservatórios, pois cianobactérias podem produzir toxinas com potenciais danos a organismos aquáticos, animais e seres humanos (Huszar, 2003), ainda implicando em aumento de custos no tratamento da água para o abastecimento público (Von Sperling, 1996). Além disso, o crescimento excessivo destes microorganismos causa o aumento da turbidez biogênica e desoxigenação da água, o que conseqüentemente gera perda de valor estético e uma cascata de efeitos negativos que resultam em perda biodiversidade aquática e impactos sobre as funções do ecossistema (Scheffer, 1998).

A dominância de cianobactérias tem sido associada a fatores ambientais como regime de mistura com estratificação duradoura (Reynolds, 1987; Beyruth, 2000) ou diária (Ganf, 1974), escassa disponibilidade de luz (Zevenboom & Mur, 1980; Smith, 1986; Beyruth, 2000); baixa razão zona eufótica/zona de mistura (Jensen et al. 1994); alta temperatura (Shapiro, 1990; Beyruth, 2000); baixo CO₂ e alto pH (Shapiro, 1990; Caraco & Miller, 1998), altas concentrações de fósforo total (Mc Queen & Lean, 1987; Watson et al. 1997); baixas de nitrogênio total (Smith, 1983) e de nitrogênio inorgânico dissolvido (Blomqvist et al. 1994) e baixa razão N/P (Smith, 1983). Aliadas às condições ambientais favoráveis, algumas características fisiológicas têm sido consideradas como potencializadoras da dominância das cianobactérias nos sistemas eutrofizados. No entanto, este fato também pode ocorrer em sistemas oligotróficos e mesotróficos (Blomqvist et al. 1994; Huszar & Caraco 1998).

No Brasil, as florações vêm aumentando em intensidade e freqüência (Azevedo, 1998; Filho et al, 2001) com dominância de cianobactérias durante grande parte do ano, sobretudo em reservatórios (Huszar & Silva, 1999; Bicudo et al., 1999; Beyruth, 2000; Calijuri et al., 2002; Bouvy et al. 2003). Fatores como temperaturas constantemente elevadas e alta luminosidade, por exemplo, típicos de clima tropical, são os principais

responsáveis pela ocorrência de florações durante todo ano no nordeste brasileiro (Molica et al. 2005).

Por outro lado, embora a sazonalidade do clima subtropical atenuar estes fatores, as florações também são comuns no sul e sudeste do Brasil, sendo frequentemente observadas durante as estações mais quentes do ano (Bouvy et al. 2000, Huszar, et al. 2000). Os gêneros mais frequentes de cianobactérias formadoras de florações em lagos e reservatórios brasileiros são *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Dolychospermum* e *Aphanizomenon*. Estudo realizado no Reservatório do Faxinal, Caxias do Sul relatam alta incidência de floração de cianobactérias do gênero *Dolychospermum* durante o verão, com a produção de cianotoxinas (Becker et al. 2009)

Florações tóxicas de cianobactérias, com danos a populações humanas pelo consumo de água contaminada já foram descritas em vários países (Chorus & Bartram, 1999). Embora eventos de toxicidade aguda de cianotoxinas causando mortalidade de seres humanos sejam raramente documentados na literatura, os efeitos de toxicidade crônica dessas cianotoxinas em animais e seres humanos ainda permanecem pouco conhecidos e representam uma grande ameaça à saúde pública.

1.1.1 Pressão de herbivoria por peixes

O processo de formação de colônias ou agregados de cianobactérias impede a predação pelo zooplâncton. Por outro lado, isto aumenta a vulnerabilidade das cianobactérias à pressão de herbivoria por peixes do gênero *Oreochromis*, tilápias, e possivelmente onívoros/filtradores nativos, como carás, do gênero *Geophagus*.

Os peixes onívoros/filtradores pertencem a uma comunidade chave em lagos e reservatórios, por ocupar posição intermediária na cadeia trófica, pois estão entre produtores primários e peixes piscívoros. Estes peixes possuem a habilidade de afetar a dinâmica do plâncton através de, no mínimo, três diferentes mecanismos: (a) consumo do zooplâncton e fitoplâncton, (b) reciclagem de nutrientes absorvidos pela produção primária e (c) oferta de alimento para peixes piscívoros.

Estudos experimentais têm procurado quantificar as taxas de ingestão de algas e cianobactérias por tilápias (*Oreochromis*) (McDonald 1985a,b; Northcott et al. 1991; Dempster et al. 1993; Beveridge et al. 1993; Keshavanath et al. 1994; Robinson et al. 1995; Turker et al. 2003a,b; Panosso et al. 2007) e carpas como a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*) em laboratório

(Xie, 2003); porém, pouco se sabe sobre interações de espécies nativas de peixes do gênero *Geophagus* com cianobactérias.

Estudos em laboratório têm demonstrado que as taxas de ingestão dependem muito do tamanho e concentração das algas e cianobactérias (Northcott et al. 1991). Evidências experimentais indicam que a taxa máxima de ingestão de cianobactérias filamentosas ou coloniais por *Oreochromis* é bem maior do que a taxa máxima de ingestão de algas e cianobactérias unicelulares (Northcott et al. 1991).

Um modelo bioenergético baseado nestas taxas de ingestão obtidos empiricamente em laboratório sugere que apenas cianobactérias coloniais e filamentosas são capazes de sustentar o crescimento e manter um balanço energético positivo em *Oreochromis*. Portanto, a alimentação por filtração só é vantajosa energeticamente para tilápias quando tais cianobactérias são suficientemente abundantes no plâncton (Dempster et al. 1995). No entanto, tilápias do gênero *Oreochromis* são peixes exóticos aos mananciais brasileiros e é preciso cautela quanto a sua utilização como ferramenta de biomanipulação em corpos de água naturais, uma vez que podem causar alterações significativas na cadeia trófica aquática.

1.2 TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS E ESTRESSE OXIDATIVO

As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* produzem microcistina e cilindrospermopsina respectivamente, consideradas toxinas hepatóxicas. As cianotoxinas podem ser classificadas quanto sua natureza química, considerando sua influência no metabolismo dos organismos expostos. Microcistina pertencem a família dos hepatopetídios cíclicos, enquanto cilindrospermopsina é um alcalóide (Gelinas et al, 2012).

Florações de cianobactérias em ecossistemas aquáticos tem o potencial de afetar, em nível toxicológico, os diversos organismos ali presentes, dos mais diversos níveis tróficos. Essa toxicidade podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando o organismo ao estresse oxidativo (Livingstone, 2001).

A vida em aerobiose é caracterizada pela contínua produção de EROs que é contrabalançada pelo sistema de defesas antioxidantes. Em condições fisiológicas normais, o balanço entre agentes pró-oxidantes e defesas antioxidantes mantém-se equilibrado, mas quando há um distúrbio, o balanço pode ser comprometido a favor dos agentes oxidantes, então, a célula ou organismo se encontra sob condição de estresse oxidativo (Klein, 2002).

Organismos em estresse oxidativo, tais como peixes, podem apresentar alterações nos padrões reprodutivos, diminuição nas taxas de sobrevivência, aumento de malformações e ocasionar eventos de mortalidade (Liu et. al, 2002).

Neste sentido, torna-se necessário avaliar se organismos que tem sua dieta baseada na ingestão de cianobactérias tóxicas, apresentarão estresse oxidativo ou estarão em equilíbrio fisiológico.

1.2.1. Controles biológicos

Uma definição ampla de controle biológico relaciona-se ao uso de organismos ou seus produtos e sua capacidade de predação, competir, eliminar ou parasitar (Pitelli, 2007). Num sentido mais específico, refere-se ao uso de organismos que interferem na sobrevivência e desenvolvimento das atividades do organismo alvo (Calvalcanti, 2006).

A predação é um processo no qual um organismo se alimenta de outro organismo, e esta relação trófica é uma importante abordagem no desenvolvimento de novas alternativas acerca do uso de um controle biológico (Calvalcanti, 2006). A utilização de peixes onívoros filtradores para controle de florações de cianobactérias vem sendo avaliada, como mencionado anteriormente, especialmente ciclídeos dos gêneros *Oreochromis*.

A Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe onívoro filtrador amplamente distribuído em reservatórios do nordeste brasileiro (Panosso et al., 2007). É uma espécie exótica introduzida nos ecossistemas aquáticos brasileiros principalmente pela atividade de piscicultura. Neste sentido, há a necessidade de se avaliar uma espécie nativa com este potencial, como por exemplo, o gênero *Geophagus*.

Peixes ciclídeos do gênero *Geophagus* podem ser encontrados numa diversidade de ambientes aquáticos como rios, arroios e lagoas, principalmente em habitats lênticos (Mazzoni & Iglesias-Rios, 2002). Ciclídeos da espécie *Geophagus brasiliensis* são classificados com uma dieta onívora, com a possibilidade de ingestão de algas fitoplânctônicas (Lemes & Garutti *caput* Castro & Casatti, 1997)

2. OBJETIVOS

- Avaliar, experimentalmente, taxas de consumo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*.
- Identificar a presença de estruturas morfológicas relacionadas à eficiência de consumo de cianobactérias em *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*.
- Avaliar a ocorrência de estresse oxidativo em *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* quando submetidos a uma dieta baseada na ingestão das cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

3. HIPÓTESES

Há diferença nas taxas de consumo de cianobactérias por peixes ciclídeos, de acordo com a concentração e espécie de cianobactéria, bem como com as diferentes espécies de peixes e tamanho dos exemplares testados.

Oreochromis sp., ciclídeo exótico, possui micro-espinhos branquiais, estruturas responsáveis pela eficiência de consumo de cianobactérias. *Geophagus brasiliensis*, ciclídeo nativo, pode apresentar tal estrutura, possibilitando sua utilização no potencial controle de cianobactérias.

Oreochromis sp. e *Geophagus brasiliensis* quando submetidos a uma dieta baseada na ingestão de cianobactérias tóxicas apresentam mecanismos de reparo ao dano oxidativo, através da ação de enzimas antioxidantes, mantendo seu metabolismo em equilíbrio.

4. CAPÍTULO 1

Formatado de acordo com as normas do periódico *Toxins*.

AValiação EXPERIMENTAL DAS TAXAS DE CONSUMO DE CIANOBACTÉRIAS POR PEIXES CICLÍDEOS

Daniela Motta Failace¹, Lucia Ribeiro Rodrigues¹, David da Motta Marques^{1,2}

1-Programa de Pós-Graduação em Ecologia- UFRGS- Porto Alegre, RS, Brasil.

2-Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos - IPH/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Email: dani.failace@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar experimentalmente a eficiência das taxas de consumo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*. Foram realizados experimentos em microcosmos: dois experimentos avaliando o potencial controle de *Oreochromis* sp. sobre *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* e dois experimentos avaliando o potencial controle de *G. brasiliensis* sobre *M. aeruginosa* e *C. raciborskii*. Foram determinados tratamentos em triplicatas, composto por peixes de duas classes de tamanho (Tratamento1: peixes de 5-10 cm; Tratamento 2: peixes de 10-15 cm); três concentrações de cianobactérias (10µg/L, 20µg/L e 40 µg/L) e controles contendo somente inóculo algáceo nas concentrações 10µg/L, 20µg/L e 40 µg/L. Análises da concentração das cianobactérias ocorreram a cada 24h durante 96h. Como resultados, no experimento avaliando o consumo de *M. aeruginosa* por *Oreochromis* sp., todas as concentrações e tratamentos apresentaram significância ($p=0,001$). Observou-se uma diminuição na concentração de cianobactérias no T1 em todas as concentrações testadas ($p<0,05$). No T2 foi observada a dependência do tamanho nas concentrações de 10µg/L e 20µg/L, e identificada uma elevação nas concentrações de *M. aeruginosa* ao longo 72h ($p<0,05$). Já no experimento avaliando o consumo de *C. raciborskii* por *Oreochromis* sp., as concentrações testadas, bem como os tratamentos apresentaram significância ($p=0,001$). No T1 foi observada uma diminuição nas concentrações de *C. raciborskii* nas concentrações testadas, no entanto a concentração 20µg/L não foi obtida significância ($p>0,05$). Na concentração 40 µg/L, o T2 apresentou-se eficiente na diminuição das concentrações de cianobactéria ao longo das 96h ($p<0,05$). No experimento avaliando as taxas de ingestão/filtração de *M. aeruginosa* por *G. brasiliensis*, somente as concentrações iniciais apresentaram significância ($p=0,001$), não apresentando dependência do tamanho para o consumo ($p>0,05$). Nas concentrações 10µg/L e 40µg/L, apesar de não apresentarem significância estatística ($p>0,05$), observou-se uma diminuição nas concentrações de cianobactérias em ambos tratamentos. A concentração 20µg/L foi significativa ($p<0,05$), entanto observou-se uma diminuição até 48h no T1 e uma elevação das concentrações de *M. aeruginosa* até 96h no T2. No experimento avaliando as taxas de

consumo de *C. raciborskii* por *G. brasiliensis*, as concentrações e os tratamentos apresentaram significância ($p=0,001$). Na concentração 10 $\mu\text{g/L}$, ocorreu uma diminuição na concentração de cianobactérias em ambos tratamentos (T1 e T2) ao longo das 96h ($p<0,05$), enquanto na concentração 20 $\mu\text{g/L}$ observou-se uma diminuição na concentração de cianobactérias em ambos tratamentos, porém apenas T2 apresentou-se estatisticamente significativo ($p<0,05$). A concentração 40 $\mu\text{g/L}$ não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), mas observou-se uma tendência de diminuição na concentração desta cianobactéria até 72h de experimento no T1 e T2. Neste sentido, os resultados evidenciaram que *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* exerceram consumo efetivo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Resultados de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram a presença de micro-espinhos branquiais, tanto em exemplares de *Oreochromis* sp. quanto em *Geophagus brasiliensis*, corroborando a hipótese que a espécie nativa pode ser utilizada como um controle biológico de cianobactérias de acordo com as condições testadas.

Palavras-chaves: Comportamento alimentar, *Oreochromis* sp., *Geophagus brasiliensis*, cianobactérias.

ABSTRAT

The aim of the study was evaluate experimentally the efficiency rates of intake/filtration of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* by *Oreochromis* sp. and *Geophagus brasiliensis*. Experiments were performed in microcosms: two experiments evaluating the potential control of *Oreochromis* sp. on *M. aeruginosa* and *C. raciborskii* and two experiments evaluating the potential control of *G. brasiliensis* on *M. aeruginosa* and *C. raciborskii*. Were determined treatments in triplicate consisting of fishes of two size classes (Treatment 1: fish 5-10 cm; Treatment 2: fish 10-15 cm); three cyanobacterial concentrations (10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ and 40 $\mu\text{g/L}$) and controls containing only algal inoculum concentrations 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ and 40 $\mu\text{g/L}$. Analysis of the concentration of cyanobacteria occurred every 24 hours for 96 hours. As a result, in the experiment using samples of *Oreochromis* sp. using the intake/filtration of cyanobacteria *M. aeruginosa* all concentrations and treatments of the experiment presents significant ($p=0.001$), there was a decrease in T1 at all concentrations tested ($p>0.05$). The T2 depending on the size presented at concentrations 10 $\mu\text{g/L}$ and 20 $\mu\text{g/L}$ but showed an increased in *M. aeruginosa* concentrations over 72 hours ($p<0.05$). In the experiment using *Oreochromis* sp. the intake/filtration of the cyanobacteria *C. raciborskii*, in an overview of the tested concentrations and treatments were significant ($p=0.001$). The T1 showed a decrease in initial concentrations of *C. raciborskii*, at all concentrations tested but the concentration 20 $\mu\text{g/L}$ analysis was not significant ($p>0.05$). At the concentration 40 $\mu\text{g/L}$ the T2 presented efficient decreasing concentrations over the 96 hours ($p<0.05$). In the experiment evaluating the intake /filtration rates of *M. aeruginosa* by *G. brasiliensis* an overview of the experiment only the concentrations were significant ($p=0.001$) with no size dependence for intake/filtration ($p>0.05$). The concentrations 10 $\mu\text{g/L}$ and 40 $\mu\text{g/L}$ despite not present significant ($p>0.05$); there is a decrease in initial concentrations of cyanobacteria in both

treatments. The concentration 20µg/L was significant however there has been a decrease until 48 hours in T1 and an increase in *M. aeruginosa* concentrations up to 96 hours in T2. However, experiment evaluating the intake/filtration rates of *C. raciborskii* by *G. brasiliensis*, concentrations and treatments were significant ($p=0.001$). The concentration 10µg/L, a decrease of the concentration of cyanobacteria in both treatments (T1 and T2) along 96h ($p<0.05$), already the concentration 20µg/L observes a decrease in the concentration of cyanobacteria in both treatments, although only T2 was statistically different ($p<0.05$). The concentration 40µg/L was not statistically significant ($p>0.05$), but there was a trend of decrease in the concentration of cyanobacteria to until 72 hours at T1 and T2. In this sense, the results showed that *Oreochromis* sp. and *Geophagus brasiliensis* exercised effective consumption of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. Results of scanning electron microscopy (SEM) analyzes revealed the presence of micro-spines in the gills of both sizes of *Oreochromis* sp. as for *Geophagus brasiliensis*, confirming the hypothesis that the native species can be used as a biological control cyanobacteria according to the conditions tested.

Key words: Behavior, *Oreochromis* sp., *Geophagus brasiliensis*, cyanobacteria.

INTRODUÇÃO

Florações de cianobactérias podem impactar os ecossistemas aquáticos tanto ecológica quanto economicamente, além de afetar a saúde humana [1]. O aumento na frequência de florações é atribuído ao processo de eutrofização e às mudanças climáticas associadas ao aumento da produção de CO₂, o que pode levar a um aumento na dominância de cianobactérias na comunidade fitoplânctônica. [3,4,5,6,7]. O processo de eutrofização produz mudanças significativas na qualidade da água, como redução do oxigênio dissolvido, mortalidade de peixes, decréscimo na diversidade de espécies da comunidade fitoplânctônica e aumento da incidência de florações de algas e cianobactérias potencialmente tóxicas [8].

No Brasil, as florações vêm aumentando em intensidade e frequência [8], com dominância de cianobactérias durante grande parte do ano, sobretudo em reservatórios de abastecimento de água [11,12,13,14]. É reportado por [8] a incidência de florações de cianobactérias em reservatórios brasileiros de abastecimento público, sendo este fato de grande preocupação à saúde humana, devido a capacidade destas cianobactérias produzirem toxinas. A expansão das florações de cianobactérias é atribuída a fatores como temperaturas constantemente elevadas e alta luminosidade, típicos de clima tropical no nordeste brasileiro [15]. Por outro lado, embora a sazonalidade do clima subtropical atenuar estes fatores, as florações também são comuns no sul e sudeste do Brasil, sendo frequentemente observadas durante as estações mais quentes do ano [16,17]. Os gêneros mais frequentes de cianobactérias formadoras de florações tóxicas em lagos e reservatórios brasileiros [8] são *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Dolychospermum* e *Aphanizomenon*. As toxinas produzidas pelas diversas espécies de cianobactérias são chamadas cianotoxinas, e sua ação pode variar de acordo com o tipo de toxina produzida. De modo geral, as toxinas podem ter ação neurotóxicas, hepatóxicas ou dermatóxicas [18].

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie formadora de grandes florações [19] Essa espécie possui uma grande tolerância fisiológica, crescimento favorecido em temperaturas de 20°C a 35°C e atribui turbidez biogênica ao sistema [20].

Oreochromis sp., conhecido como tilápia, de acordo com vários estudos [21,22,23,24,25,26,27,28] é um ciclídeo que tem a capacidade de consumir pequenas partículas orgânicas, como fitoplâncton, incluindo cianobactérias. Tal capacidade é devida a presença de estruturas denominadas micro-espinhos branquiais [29]. Entretanto, peixes do gênero *Oreochromis* são peixes exóticos aos mananciais brasileiros e é preciso cautela quanto a sua utilização como ferramenta de biomanipulação/restauração em corpos de

águas naturais, uma vez que podem causar alterações significativas na cadeia trófica aquática. *Geophagus brasiliensis* é um ciclídeo nativo conhecido como cará ou acará, que habita ambientes lênticos como lagoas de planície de inundação [30] e lagoas costeiras [31]. Estudos da dieta de *Geophagus* indicam uma grande plasticidade trófica, apresentando como itens alimentares preferenciais algas filamentosas, além de fragmentos de vegetais superiores, restos de insetos, escamas e nadadeiras de peixes, além de sedimentos [32]. *Geophagus brasiliensis* como um ciclídeo, pode apresentar tal estrutura branquial, porém sem registro na literatura científica até o momento, bem como sem informações publicadas sobre seu comportamento alimentar no que se refere ao consumo de cianobactérias. A existência de micro-espinhos branquiais em *Geophagus brasiliensis* possibilita a utilização desta espécie no potencial controle de cianobactérias. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar experimentalmente as taxas de ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*, bem como avaliar quais estruturas morfológicas destes indivíduos podem influenciar no seu comportamento alimentar.

RESULTADOS

Nos experimentos com *Oreochromis* sp., a taxa de sobrevivência foi de 84,40% no experimento 1 (E1) e 66,52% no experimento 2 (E2). Já em ambos os experimentos utilizando *Geophagus brasiliensis* (E3 e E4) a sobrevivência foi de 99,00%.

Avaliação das taxas de ingestão/filtração de cianobactérias por *Oreochromis* sp.

As análises referentes à primeira hipótese, verificando se há diferença na ingestão/filtração dos ciclídeos de acordo com a concentração e espécie de cianobactérias, e tamanhos dos exemplares foram realizadas através de ANOVA *Two-Way* para cada experimento. No experimento 1 (E1), nas concentrações-teste 10µg/l, 20µg/l e 40µg/l de *Microcystis aeruginosa* no tratamento 1 (T1), peixes de 5-10 cm e tratamento 2 (T2), peixes de 10-15cm, observou-se significância ($p=0,001$). Na concentração 10µg/l observou-se que a ingestão/filtração foi dependente do tamanho dos peixes. No T2 em ocorreu um aumento na concentração de *M. aeruginosa* ao longo das 96 horas, enquanto que no T1 não foi identificada diferença estatisticamente significativa, apesar de ocorrer um decréscimo ao longo do período experimental (Figura 1-A). Da mesma forma, na concentração 20µg/l observou-se significância ($p<0,05$), com uma consumo de *M. aeruginosa* depende do tamanho. Embora no T1 tenha ocorrido uma diminuição até as 72h de experimento, esta

diminuição não foi significativa ($p>0,05$) em relação ao controle. Apenas no T2 observou-se diferença significativa em relação ao controle, entretanto a concentração de cianobactérias aumentou ao longo das 96h (Figura 1-B). Na concentração 40 μ g/l, ambos os tratamentos não foram significativos ($p>0,05$), porém no T1 ocorreu um pequeno decréscimo na concentração de cianobactérias ao longo do tempo (Figura 1-C).

No experimento 2 (E2), nas concentrações-teste 10 μ g/l e 40 μ g/l de *Cylindrospermopsis raciborskii* nos tratamentos 1 e 2, (T1 e T2) observou-se significância ($p=0,001$). Na concentração 10 μ g/l a taxa de ingestão/filtração da cianobactéria foi dependente do tamanho dos peixes ($p<0,05$). No T1 observou-se uma diminuição ao longo das 96h, no entanto, no T2 evidenciou-se um aumento na concentração de cianobactérias durante a período experimental. Na concentração 20 μ g, não foi observada significância nas taxas de consumo de *C. raciborskii* para os tratamentos ($p>0,05$), entretanto observou-se que apenas no T1, a concentração de *C. raciborskii* diminuiu ao longo das 96h em relação ao controle (Figura 2-B). A concentração 40 μ g/l apresentou uma taxa de ingestão/filtração de *C. raciborskii* dependente do tamanho dos organismos-teste ($p=0,001$). Em ambos os tratamentos observou-se diminuição na concentração de cianobactérias em relação ao controle (Figura 2-C).

Avaliação das taxas de ingestão/filtração de cianobactérias por *Geophagus brasiliensis*

No experimento 3 (E3), nas concentrações-teste de *Microcystis aeruginosa*, a taxa de ingestão/filtração, para a maioria dos tratamentos, não foi dependente do tamanho dos peixes ($p>0,05$). Apenas na 20 μ g/l foi identificada diferença significativa ($p<0,05$), sendo a taxa de consumo dependente do tamanho dos organismos-teste (Figura 3-A, B, C).

No Experimento 4 (E4), considerando as taxas de consumo de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Geophagus brasiliensis*, na concentração 10 μ g/l, em ambos os tratamentos (T1 e T2) observou-se significância ($p<0,05$), com decréscimo da concentração de cianobactérias ao longo das 96h (Figura 4-A). Na concentração 20 μ g/l evidenciou-se significância ($p<0,05$), observando-se uma taxa de ingestão/filtração dependente do tamanho dos peixes. O T2 apresentou-se diferente do controle, diminuindo a concentração de cianobactéria ao longo das 96h, enquanto, embora no T1 não tenha sido identificada significância, pode-se observar decréscimo da concentração de *C. raciborskii* ao longo das 96h (Figura 4-B). Na concentração de 40 μ g/l, não houve significância ($p>0,05$) porém, pode-se observar que a concentração de cianobactéria decresceu até as 48h, elevando-se em relação ao controle experimental até as 96h (Figura 4-C).

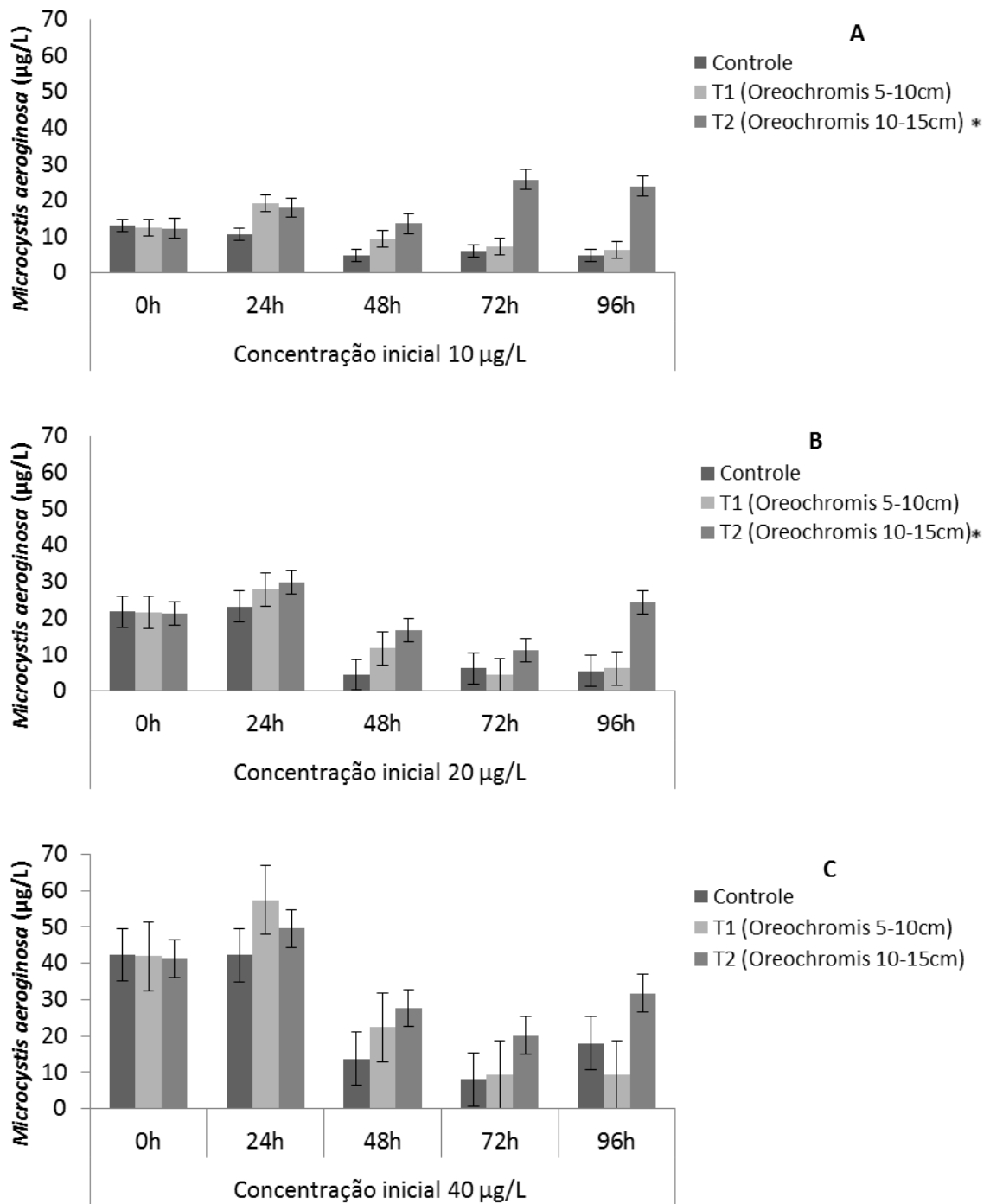


Figura 1. Concentração de *Microcystis aeruginosa* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Oreochromis* sp. 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Oreochromis* sp. 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *M. aeruginosa*. Os asteriscos indicam significância dos tratamentos ($p < 0,05$).

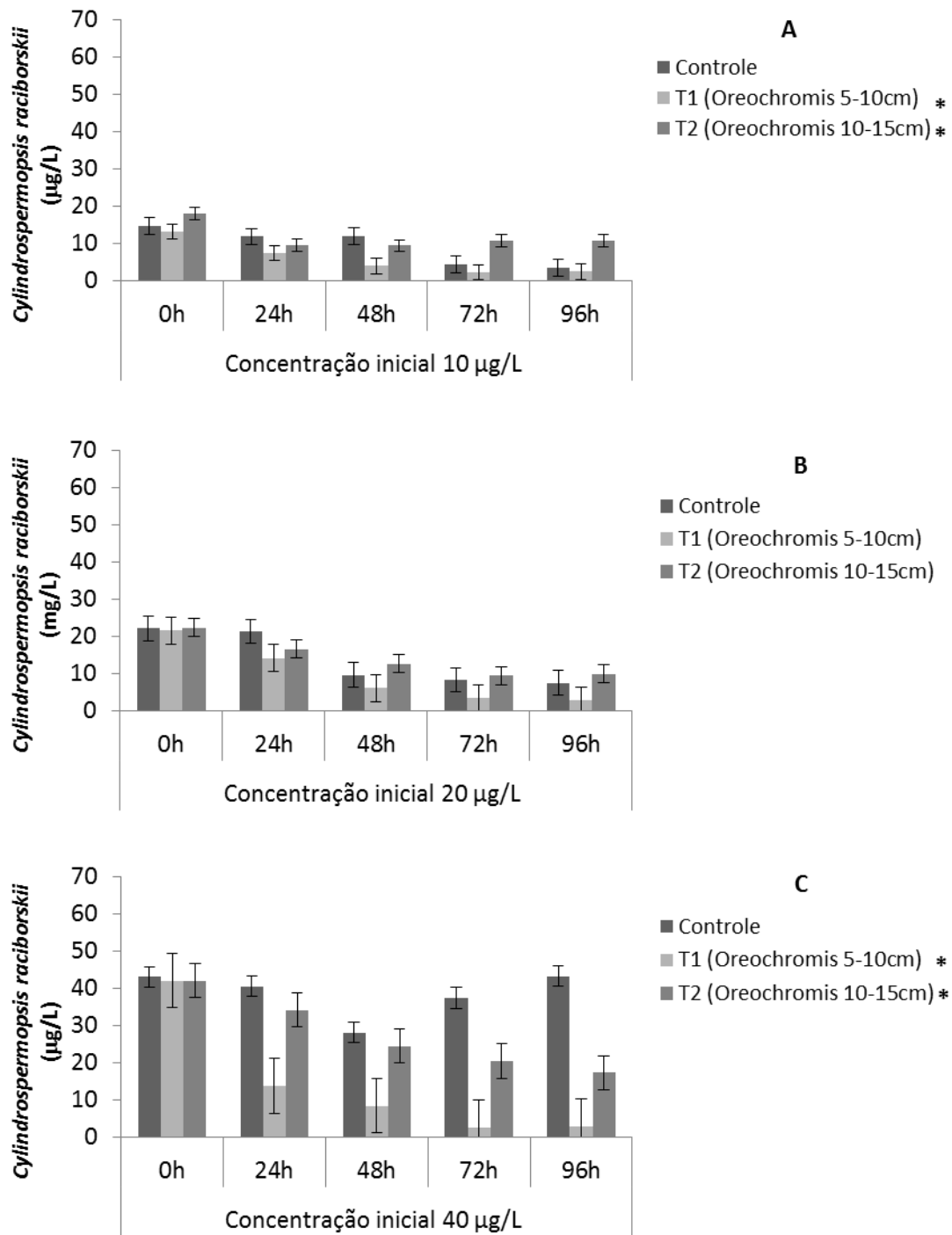


Figura 2. Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Oreochromis* sp. 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Oreochromis* sp. 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *C. raciborskii*. Os asteriscos indicam significância dos tratamentos ($p < 0,05$).

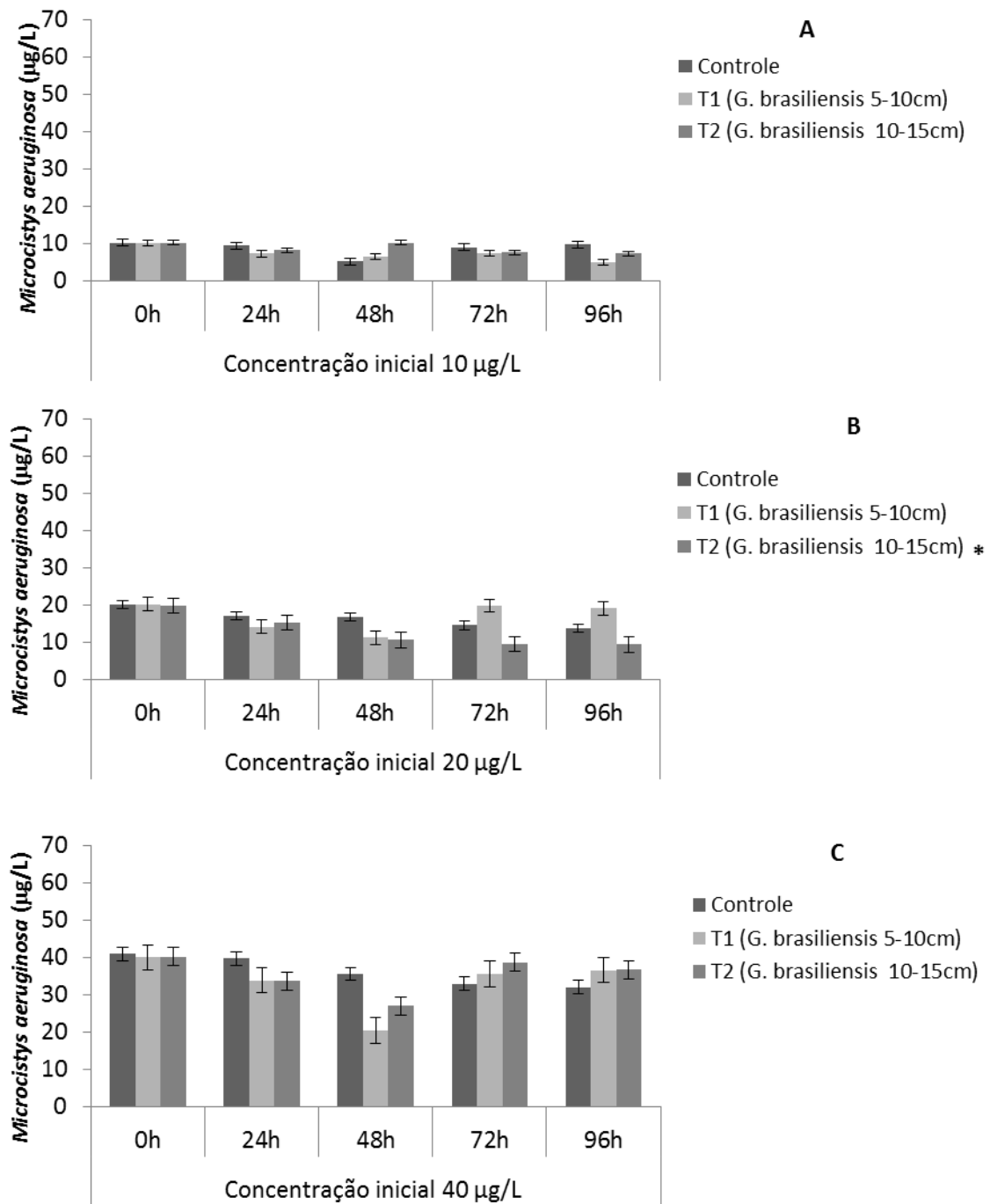


Figura 3. Concentração de *Microcystis aeruginosa* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Geophagus brasiliensis* 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Geophagus brasiliensis* 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *M. aeruginosa*. Os asteriscos indicam significância dos tratamentos ($p < 0,05$).

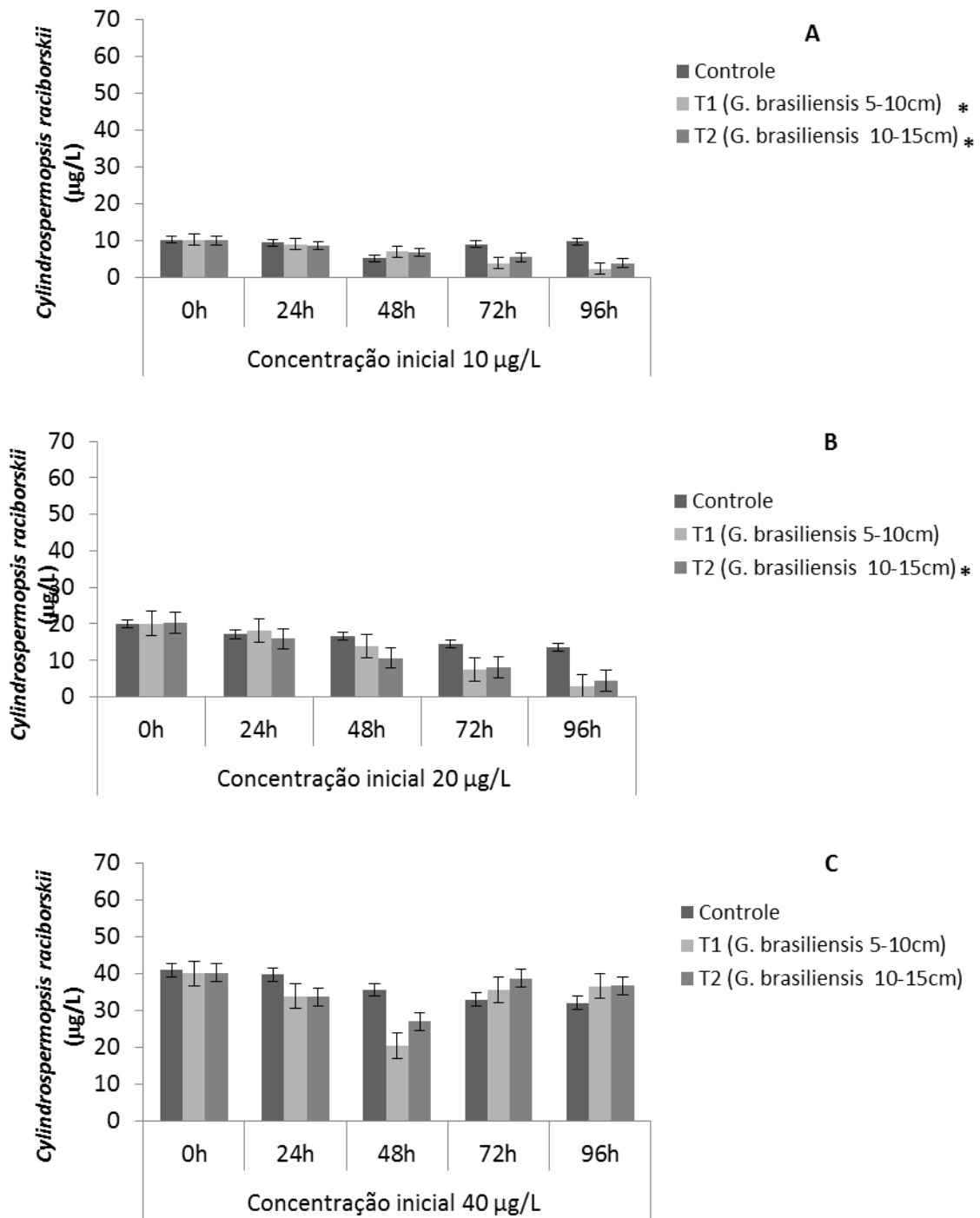


Figura 4. Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao longo de 96 horas de exposição a diferentes tratamentos: tratamento 1 – T1 (*Geophagus brasiliensis* 5 – 10cm) e tratamento 2 – T2 (*Geophagus brasiliensis* 10 – 15cm) considerando inóculo inicial 10 µg/L (A), 20 µg/L (B) e 40 µg/L (C) de *C. raciborskii*. Os asteriscos indicam significância dos tratamentos ($p < 0,05$).

As tabelas 1 e 2 resumem os resultados da análise estatística referente à capacidade de consumo efetivo de cianobactérias pelas duas espécies de peixes avaliadas. Para ambas as espécies de cianobactérias em análise, *Oreochromis* sp. apresentou uma eficácia de consumo dependente do tamanho dos exemplares e concentração inicial do inóculo (ANOVA, $p < 0,05$), enquanto que o mesmo não foi observado para *Geophagus brasiliensis* (ANOVA, $p > 0,05$). Com relação à eficiência no consumo de *C. raciborskii*, identificou-se diferença de eficácia entre *Oreochromis* sp. de 5-10 cm em relação aos exemplares de 10-15 cm, tanto na concentração inicial de inóculo de 20µg/L quanto de 40µg/L (Teste t, $p < 0,0007$). Quando analisadas em conjunto, independentemente da concentração inicial de inóculo, exemplares de *Oreochromis* sp. das duas classes de tamanho apresentaram diferença altamente significativa ($p = 0,0000$). Enquanto exemplares de *Oreochromis* sp. de 5-10 cm apresentaram-se eficientes no consumo de *C. raciborskii* ($p = 0,01404$; Teste Z, $p = 0,0000$; Fig. 5); exemplares de *Oreochromis* sp. maiores que 10 cm não foram capazes de promover um balanço efetivo de consumo (remoção) de cianobactérias ($\phi = -0,00214$; Teste Z, $p = 0,9656$). Com relação a *Geophagus brasiliensis*, embora não se tenha identificado diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p = 0,0780$), identificou-se que a espécie, independentemente de tamanho ou concentração inicial de cianobactérias foi capaz de realizar redução efetiva da concentração de *C. raciborskii* ($\phi = -0,01509$; Teste Z, $p = 0,000$; Fig. 6). Quando comparadas as duas espécies de peixes, avaliando-se o consumo efetivo de *C. raciborskii* não houve diferença significativa de eficácia entre *Oreochromis* sp. de 5-10 cm (tilápias pequenas) e *Geophagus brasiliensis* (Teste t, $p = 0,3307$). Resultado diferente foi obtido para *M. aeruginosa*, onde a capacidade de consumo de cianobactérias foi significativa apenas para exemplares de *Oreochromis* sp. de 5-10 cm (tilápias pequenas) ($\phi = -0,00341$; Teste Z, $p = 0,002$; Fig.7). Mesmo assim, identificou-se que tilápias de pequeno porte são cerca de quatro vezes mais eficientes no consumo de *Cylindrospermopsis raciborskii* do que *Microcystis aeruginosa* (Teste t bicaudal, variâncias diferentes, $p = 0,0004$), sugerindo que o consumo das cianobactérias apresenta relação direta com o tamanho e morfologia da espécie de cianobactéria, ou mesmo ao potencial efeito de cianotoxinas.

Tabela 1. Valores de significância para o teste de hipótese, referente à análise de eficiência de consumo da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* pela espécie de peixe exótica *Oreochromis* sp. (tilápia) e pelo peixe nativo *Geophagus brasiliensis* (cará) em experimentos de 96 horas de duração, com determinação da concentração de cianobactérias a cada 24 horas. Cada experimento compreendeu três módulos em triplicata: peixes pequenos (entre 5 e 10cm); peixes grandes (entre 10 e 15cm) e controle (sem peixes). Cada módulo contou com duas concentrações iniciais de cianobactérias; 20 e 40µg/L.

<i>Oreochromis</i> sp. (tilápia)		
Diferença entre Tratamentos	0,0000	ANOVA de fator único
Tilápia Pequena x Grande 20µg/L	0,0007	Teste t unicaudal, variâncias iguais
Tilápia Pequena x Grande 40µg/L	0,0005	Teste t unicaudal, variâncias iguais
Tilápias Pequenas 20 x 40 µg/L	0,7457	Teste t bicaudal, variâncias iguais
Tilápias Grandes 20 x 40 µg/L	0,6402	Teste t bicaudal, variâncias iguais
Tilápia Pequena x Grande Total	0,0000	Teste t unicaudal, variâncias iguais
<i>Geophagus brasiliensis</i> (cará)		
Diferença entre Tratamentos	0,0780	ANOVA de fator único
<i>Oreochromis</i> sp. (tilápia) x <i>Geophagus brasiliensis</i> (cará)		
Tilápia Pequena x Cará	0,3307	Teste t unicaudal, variâncias diferentes
Tilápia Grande x Cará	0,0000	Teste t unicaudal, variâncias diferentes
Teste do Coeficiente de Consumo Líquido (ϕ) (Diferença em relação a Zero)		
Tilápia Pequena	0,0000	Teste Z
Tilápia Grande	0,9656	
Cará	0,0000	

Tabela 2. Valores de significância para teste o de hipótese, referente à análise de eficiência de consumo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* pela espécie de peixe exótica *Oreochromis* sp. (tilápia) e pelo peixe nativo *Geophagus brasiliensis* (cará) em experimentos de 96 horas de duração, com determinação da concentração de cianobactérias a cada 24 horas. Cada experimento compreendeu três módulos em triplicata: peixes pequenos (entre 5 e 10cm); peixes grandes (entre 10 e 15cm) e controle (sem peixes). Cada módulo contou com duas concentrações iniciais de cianobactérias; 20 e 40µg/L.

<i>Oreochromis</i> sp. (tilápia)		
Diferença entre Tratamentos	0,0010	ANOVA de fator único
Tilápia Pequena x Grande 20µg/L	0,3927	Teste t unicaudal, variâncias iguais
Tilápia Pequena x Grande 40µg/L	0,0001	Teste t unicaudal, variâncias iguais
Tilápias Pequenas 20 x 40 µg/L	0,7491	Teste t bicaudal, variâncias iguais
Tilápias Grandes 20 x 40 µg/L	0,0067	Teste t bicaudal, variâncias iguais
Tilápia Pequena x Grande Total	0,0071	Teste t unicaudal, variâncias iguais
<i>Geophagus brasiliensis</i> (cará)		
Diferença entre Tratamentos	0,1799	ANOVA de fator único
<i>Oreochromis</i> sp. (tilápia) x <i>Geophagus brasiliensis</i> (cará)		
Tilápia Pequena x Cará	0,0026	Teste t unicaudal, variâncias diferentes
Tilápia Grande x Cará	0,4710	Teste t unicaudal, variâncias diferentes
Teste do Coeficiente de Consumo Líquido (ϕ) (Diferença em relação a Zero)		
Tilápia Pequena	0,0002	Teste Z
Tilápia Grande	0,8381	
Cará	0,8807	

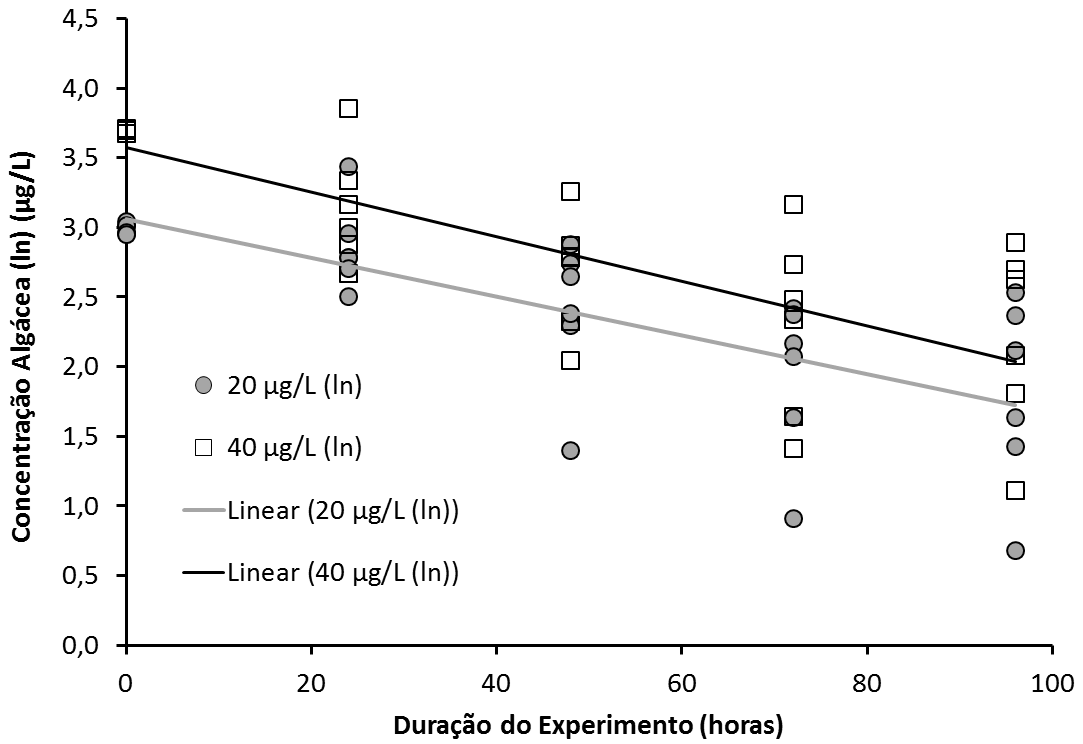


Figura 5. Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* em aquários com *Oreochromis* sp. (tilápia) com tamanhos entre 5 e 10 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas.

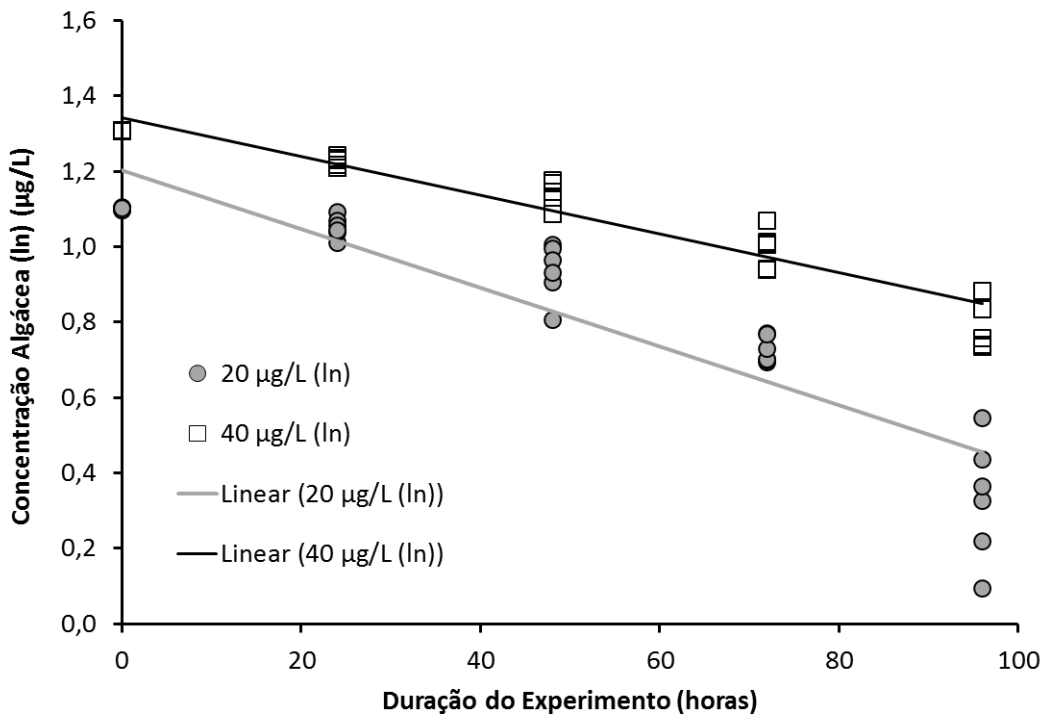


Figura 6. Concentração de *Cylindrospermopsis raciborskii* em aquários com *Geophagus brasiliensis* (cará) com tamanhos entre 5 e 15 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas.

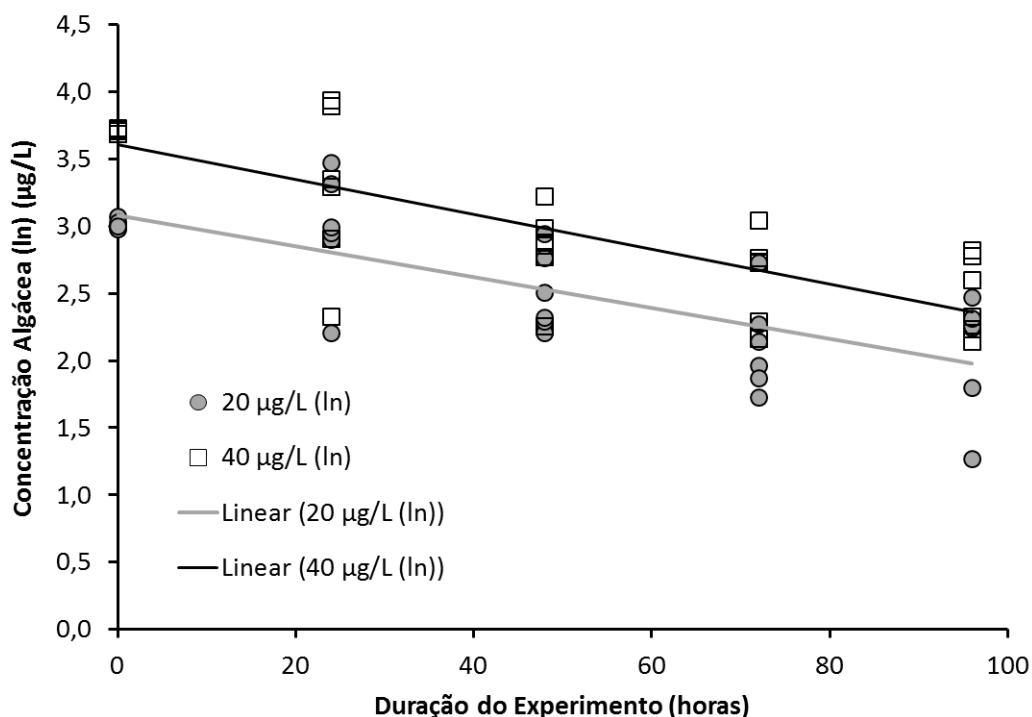


Figura 7. Concentração de *Microcystis aeruginosa* em aquários com *Oreochromis* sp. (tilápia) com tamanhos entre 5 e 10 cm em experimentos com inóculo de 20 e 40µg/L e duração de 96 horas.

Análise da morfometria das brânquias

A visualização das imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura para a obtenção dos dados de comprimento filamentar e espaço intrafilamentar ocorreu em aproximação de 40X e para a visualização e quantificação dos micro-espinhos branqueais, aproximação 300X. Os exemplares de *Oreochromis* sp. do T1 (5-10cm) apresentaram comprimento filamentar médio de $2,84\text{mm} \pm 0,08$ mm, espaço intrafilamentar médio de $0,08\text{mm} \pm 0,02\text{mm}$ e micro-espinho branquial com a área média de $5,01 \text{ mm} \pm 0,80$. Enquanto os exemplares do T2 (10-15 cm) apresentaram comprimento filamentar médio de $4,11 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$, espaço filamentar médio de $0,10 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$ e micro-espinho branquial com área média de $10,43 \text{ mm} \pm 1,71\text{mm}$.

Os exemplares de *Geophagus brasiliensis* do T1 possuem comprimento filamentar médio de $2,97 \text{ mm} \pm 0,05\text{mm}$, espaço filamentar médio de $0,060 \text{ mm} \pm 0,002 \text{ mm}$ e micro-espinho branquial com área média de $6,51 \text{ mm} \pm 0,75 \text{ mm}$. Enquanto os exemplares do T2 possuem comprimento filamentar médio de $2,72 \text{ mm} \pm 0,02 \text{ mm}$, espaço filamentar médio de $0,046 \text{ mm} \pm 0,002 \text{ mm}$ e microespinho branquial com área média de $10,57 \text{ mm} \pm 0,75\text{mm}$. Na figura 8 é possível observar tais estruturas analisadas em *Oreochromis* sp. e *G. brasiliensis*.

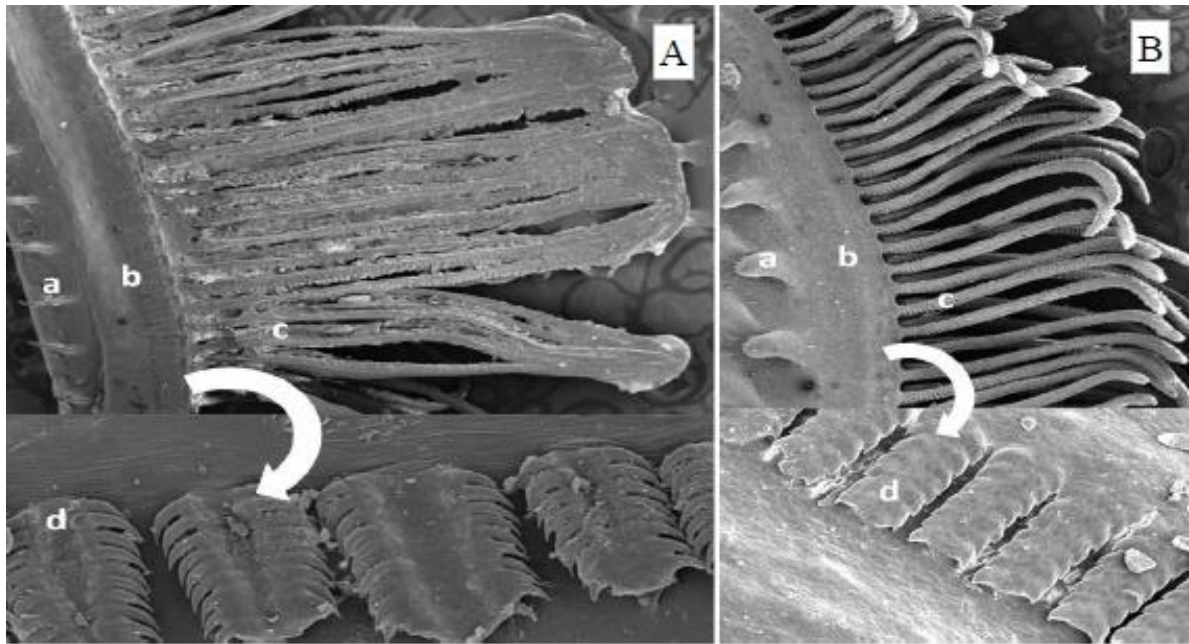


Figura 8. (A) Elétron-micrografia de varredura da brânquia de *Oreochromis* sp. (a) Rastro branquial; (b) arco branquial; (c) filamento branquial; (d) micro-espinho branquial; (B) Elétron-micrografia de varredura da brânquia de *Geophagus brasiliensis*. (a) Rastro branquial; (b) arco branquial; (c) filamento branquial; (d) micro-espinho branquial.

DISCUSSÃO

Cianobactérias multiplicam-se rapidamente em corpos d'água formando florações quando encontram condições favoráveis, como altas temperaturas, luz intensa, aumento da disponibilidade de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, introduzidos nos mananciais pelos efluentes gerados por atividades antropogênicas [33,34].

As cianobactérias aqui testadas diferem quanto a sua morfologia e conteúdo nutricional, e este fato pode influenciar diretamente a quantidade de células que são ingeridas pelos organismos-teste durante os experimentos, e potencialmente em condições naturais. *Cylindrospermopsis raciborskii*, é uma cianobactéria filamentosa, com filamentos ligeiramente curvados ou em espiral com heterocistos terminais e elipsoides [35]. Enquanto *Microcystis aeruginosa* é cianobactéria unicelular globulosa que nas condições-teste não apresentou bainha de mucilagem, mas em ambientes naturais pode apresentar, diminuindo a pressão de predação [36].

Nos experimentos realizados com *Geophagus brasiliensis* avaliando a ingestão/filtração de *Cylindrospermopsis raciborskii*, em todos os tratamentos e concentrações avaliadas foi observado um decréscimo acentuado na concentração desta

cianobactéria ao longo do tempo, demonstrando o potencial controle desta espécie nativa sobre *C. raciborskii*.

Em estudo de [37], a ocorrência da forma colonial de *Microcystis aeruginosa* (agregados unicelulares envoltos por bainha de mucilagem) foi evidenciada somente no ambiente natural, prevalecendo em condições laboratoriais a forma unicelular globulosa. Esta informação revela que a morfologia e o “estado de organização” das células das cianobactérias é um fator que pode ter influência efetiva nas taxas de ingestão/filtração pelos peixes.

No presente estudo, a morfologia das cianobactérias testadas difere quanto ao tamanho e à forma, e estas características influenciaram diretamente as taxas de filtração, visto que as brânquias dos ciclídeos avaliados retiveram mais *Cylindrospermopsis raciborskii* do que *Microcystis aeruginosa*. Supõe-se, então, que seja necessário um menor número de células de *C. raciborskii* para suprir energeticamente a demanda calórica das espécies de peixes avaliadas ou a toxicidade destas cepas pode atuar de forma diferenciada.

Em termos comparativos, apesar de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* não apresentarem grande eficiência na ingestão/filtração de *M. aeruginosa* quando comparada com *C. raciborskii*, observou-se evidências de consumo desta cianobactéria nas condições experimentais testadas.

Considerando que os aspectos morfológicos das brânquias podem influenciar as taxas de consumo efetivo, *Geophagus brasiliensis* apresentou, através das análises de MEV, a ocorrência de micro-espinhos branquiais, que no gênero *Oreochromis* que já havia sido descrita nos estudos de [25] como a principal estrutura responsável na retenção de fitoplâncton, especialmente cianobactérias. Este resultado confirma a hipótese testada, de que a presença desta estrutura é característica da família dos ciclídeos e, sobretudo, valida a possibilidade de *G. brasiliensis* poder ser utilizado como controlador natural de cianobactérias.

Neste estudo, ambas as cianobactérias testadas são conhecidas por produzirem cianotoxinas. Cianotoxinas podem ser classificadas conforme critérios de acordo com sua ação e composição: mecanismo de ação no organismo (hepatotóxicas ou neurotóxicas) e classificação em termos de estrutura química. Considerando os mecanismos de ação, as cianotoxinas de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* são classificadas como hepatotóxicas, porém quanto sua classificação química, microcistina é um heptapetídeo cíclico e cilindrospermopsina, um alcaloide guanidínico, conforme a revisão de [38], podendo influenciar o metabolismo dos organismos de forma diferenciada.

Conforme a revisão de [38], a exposição de peixes nos fases iniciais de desenvolvimento à microcistina pode afetar diretamente seu desenvolvimento embrionário, taxas de sobrevivência e desenvolvimento, como também causar alterações morfológicas. Neste sentido, sugere-se avaliar o efeito das cianotoxinas hepatotóxicas deste estudo nos organismos-teste utilizados nos experimentos para verificar a ocorrência de mecanismos de dano-reparo enzimático, através da realização de ensaios ecotoxicológicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidenciou que *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* exerceram consumo efetivo das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* sob condições controladas. Porém, para afirmar se estas espécies de ciclídeos são passíveis de utilização como controladores biológicos efetivos de cianobactérias como estratégia de manejo, há a necessidade de avaliações ecotoxicológicas que demonstrem se essas populações, mesmo em condições laboratoriais, sofrerão danos metabólicos que podem ser causados pela toxicidade das cianobactérias/cianotoxinas, considerando que tais danos podem influenciar taxas de reprodução, sobrevivência e crescimento destes organismos no ambiente natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos-teste e cianobactérias utilizadas dos experimentos

Exemplares de *Oreochromis* sp. foram obtidos em um criatório tanque-rede localizado a 70 km de Porto Alegre, RS, e exemplares de *Geophagus brasiliensis* foram coletados na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS) distante 30 km Porto Alegre, RS. As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (NPLJ4) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3) foram obtidas do banco de cultura próprio do laboratório de Ecotecnologia e Limnologia Aplicada, no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Delineamento experimental, parâmetros analisados e metodologia analítica

Experimentos avaliando o potencial controle de *Geophagus brasiliensis* (cará - espécie nativa) e *Oreochromis* sp. (tilápia - espécie exótica) sobre as cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* foram realizados. Os experimentos utilizando *Oreochromis* sp. foram realizados no verão de 2013 e com *Geophagus brasiliensis*, no verão de 2014.

Os peixes utilizados nos experimentos foram previamente aclimatados em aquários em condições controladas de luz e temperatura ($300 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR em um ciclo de 12:12 (12 horas/claro, 12 horas/escuro) a 25°C) por 48h e depois privados de alimentação 24 horas antes do início do experimento. Foram determinados nove tratamentos em triplicatas compostos por peixes de duas classes de tamanho, três concentrações de cianobactérias e controles contendo somente inóculo algáceo nas concentrações iniciais 40 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$, conforme segue:

- Cianobactérias (40 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (40 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Cianobactérias (20 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (20 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Cianobactérias (10 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (10 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Controle 40 $\mu\text{g/L}$ cianobactérias
- Controle 20 $\mu\text{g/L}$ cianobactérias
- Controle 10 $\mu\text{g/L}$ cianobactérias

O tratamento 1 (T1) foi composto por peixes de 5-10 cm, enquanto que o tratamento 2 (T2) foi composto por peixes de 10-15cm. Foram realizados quatro experimentos; experimento 1 (E1), avaliando a ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* por *Oreochromis* sp.; experimento 2 (E2), avaliando a ingestão/filtração de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp.; experimento 3 (E3), avaliando a ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* por *Geophagus brasiliensis* e experimento 4 (E4), avaliando a ingestão/filtração de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Geophagus brasiliensis*.

Aquários-teste foram dispostos aleatoriamente e abastecidos com água tratada (2L) desclorada e com aeração constante. Os exemplares utilizados nos experimentos foram medidos e pesados e acondicionados em seu respectivo tratamento. O inóculo inicial de cianobactéria foi adicionado e em seguida quantificado através de fluorômetro Phyto-Pam®, expresso em $\mu\text{g/L}$. Análises da concentração de cianobactérias na água ocorreram a cada 24 horas durante 96h. Durante os experimentos os indivíduos controles receberam ração comercial *ad libitum*, a vontade.

Análise da morfologia/morfometria das brânquias

Análises morfométricas/morfológicas nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* foram realizadas para avaliar o comprimento do filamento branquial e espaços intrafilamentar. A existência de micro-espinhos branquiais foi verificada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Nas análises de MEV as brânquias foram fixadas com solução de glutaraldeído 25%, desidratadas em série cetônica (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e em seguida conduzida à secagem em ponto crítico de CO₂ em aparelho Balzers CPD 030. Após esta etapa, as amostras foram fixadas em suportes metálicos (*stubs*), sobre fita adesiva de carbono e cobertas com ouro em metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater. A visualização das lâminas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 5800 SCANNING MICROSCOPE), com auxílio do software *Noran System SIX*, version 1.8. As análises foram realizadas conforme protocolo do Centro Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

Análise estatística

Para avaliar a eficiência da ingestão/filtração de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* considerando os tratamentos e concentrações testadas foi utilizada ANOVA *two-way* com randomização, utilizando-se o software Multiv versão 3.31b. Para evidenciar diferenças entre os tratamentos foi realizada análise da variância ANOVA *ano-way*.

A hipótese nula (H₀) testada foi de que não há diferença significativa ($\alpha=0,05$) entre os tratamentos, sendo a probabilidade α calculada por 1000 interações [39], usando a soma dos quadrados das distâncias euclidianas calculadas entre as amostras. Contrastes foram usados para avaliar diferenças entre os tratamento. Para testar a influência das variáveis morfológicas na capacidade de ingestão/filtração dos peixes foram realizadas regressões múltiplas, utilizando-se o software Past versão 2.17b. Previamente às análises, os dados foram padronizados pelo máximo.

Com o objetivo de avaliar o coeficiente de consumo líquido (ϕ) de cada espécie de peixe em relação à ingestão/filtração das cianobactérias *M. aeruginosa* e *C. raciborskii*, uma matriz experimental constituiu-se do conjunto dos experimentos. Cada experimento compreendeu três módulos em triplicata: (Módulo 1) peixes pequenos (entre 5 - 10cm; P1-P3); (Módulo 2) peixes grandes (entre 10 - 15cm; G1-G3) e (Módulo 3) controle (sem peixes; C1-C3). Cada módulo contou com as maiores concentrações iniciais de cianobactérias (20 µg/L e 40µg/L), conforme segue.

			Módulo 1 Peixes Pequenos (5-10 cm)			Módulo 2 Peixes Grandes (10-15 cm)			Módulo 3 Controle (sem peixes)		
			P1	P2	P3	G1	G2	G3	C1	C2	C3
EXPERIMENTOS	Concentração Algácea 20µg/L	0h									
		24h									
		48h									
		72h									
		96h									
	Concentração Algácea 40µg/L	0h									
		24h									
		48h									
		72h									
		96h									

Para análise de dados, as concentrações de cianobactérias quantificadas a cada 24 horas foram logaritmizadas (logaritmo natural) para fins de linearização do padrão exponencial de crescimento/mortalidade, estimando-se o coeficiente de regressão (inclinação da reta) para dada unidade experimental. Considerando que a variação da concentração de algas depende do consumo das mesmas pelos peixes, assim como do crescimento da população algácea, subtraiu-se do valor de cada coeficiente de regressão (P1-P3; G1-G3) o valor do respectivo controle (C1-C3) de forma a medir-se a resposta líquida decorrente (ϕ ; coeficiente de consumo líquido) da presença dos peixes nos aquários-teste ($\phi > 0$, consumo efetivo; $\phi = 0$, efeito neutro; $\phi < 0$, estimulação da população algácea). A identificação de efeito para cada espécie de peixe em interação com cada uma das duas espécies de cianobactérias foi testada através de ANOVA de fator simples. Uma vez identificada diferença significativa entre tratamentos, estes foram comparados dois a dois através de teste t, presumindo-se variâncias iguais, em teste unicaudal para tamanhos (presumida maior eficiência de peixes pequenos, 5-10cm) e teste bicaudal entre concentrações (sem presunção de resultado esperado). Os tratamentos em que não foi identificada diferença significativa foram agrupados para fins de comparação entre as espécies de peixes, a qual foi efetuada através de teste t unicaudal (hipotetizada maior eficiência da tilápia) e presumindo-se variâncias distintas. Por fim, a eficácia líquida dos tratamentos, ou seja, a capacidade de filtração de cianobactérias por consumo direto é maior que a estimulação pela excreta nitrogenada dos peixes, foi testada através de teste Z, comparando-se o coeficiente de consumo líquido (ϕ) com zero ($\phi > 0$, consumo efetivo; $\phi = 0$, efeito neutro; $\phi < 0$, estimulação da população algácea).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hallegraeff (1993), G. M.A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*:Vol. 32, No. 2, pp. 79-99. doi: <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-32-2-79>.
2. Beardall J, Ihnken S, Quigg A., (2009) Gross and net primary production: closing the gap between concepts and measurements. *Aquat Microb Ecol* 56: 113–122.
3. Paerl,H. W.& Huisman,J., (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep.* (1):27-37. doi: 10.1111/j.1758 2229.2008.00004.x.
4. Mooijet, W.M., Janse, J.H., De Senerpont Domis, L.N., Hulsmann S., Ibelings, B.W. (2005). Predicting the effect of climate change on temperature shallow lakes with the ecosystem model PC Lake. *Hydrobiologia*, 584: 443-454.
5. Jeppesen, Meerhoff, Thomas A. Davidson, Dennis Trolle, Martin Søndergaard, Torben L. Lauridsen, Meryem Beklioglu, Sandra Brucet, Pietro Volta, Iván González-Bergonzoni, Anders Nielsen1; Climate change impacts on lakes: an integrated ecological perspective based on a multi-faceted approach, with special focus on shallow lakes. *J. Limnol.*, (2014); 73(s1): 88-111.
6. Wagner, C. & Adrian, R. (2009). Cyanobacteria dominance: Quantifying the effects of climate change.*Limnol. Oceanogr.*, 54(6, part 2), 2460–2468.
7. CESTEB. 2013. Manual de cianobactérias planctônica: Legislação, orientação para o monitoramento e aspectos ambientais. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil.
8. Azevedo, S.M.F.O. (1998). Toxinas de Cianobactérias: causas para saúde pública. *Medicina on line.* 1(3): 1-22.
9. Huszar, V.L.M. & Silva, L.H. (1999). Estrutura da comunidade fitoplantônica no Brasil: cinco décadas de estudos. *Limnotemas* 2: 17p.
10. Ramírez, R.J.J.; Tucci, A.; Bicudo, D.C.(1999).Dinâmica de populações fitoplantônica sem ambiente eutrofizado: O Lago das Graças, SãoPaulo.In:Henry,R.(ed). *Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos.* Botucatu: FAPESP. pp. 451-507.
11. Beyruth, Z. (2000). Periodic disturbances, trophic gradient and phyto plankton characteristics relatedto Cyanobacterial growth in Guarapiranga Reservoir, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* 424: 51-65.
12. Calijuri, M.C., Dos Santos, A. C. A. & Jati, S. (2002). Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, S.P.-Brazil). *Journal of Plankton Research*, 24: 617-634.
13. Bouvy, M.; Nascimento, M.S.; Molica, R.J.R.; Ferreira, A.; Huszar, V. & Azevedo, M.F.O. (2003). Limnological features in tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. *Hydrobiologia* 493: 115-130.
14. Molica, R.J.R.; Oliveira, E.J.A.; Carvalho, P.V.V.C; Costa, A.N.S.F.; Cunha, M.C.C.; Melo, G.L. & Azevedo, S. M. F. O. (2005). Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743-753.
15. Bouvy,M.;Falcão,D.;Marinho,M.;Pagano,M.andMoura,A.(2000).Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during (1998) drought.*Aquatic Microbial Ecology* 20: 285-297.

16. Huszar, V.L.M.; Silva, L.H.S.; Marinho, M.; Domingos, P. and Anna, C.L.S. (2000). Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424: 67-77.
17. McDonald, M. E. (1985) a Carbon budgets for a phytoplanktivorous fish fed three different unialgal populations. *Oecologia* 66: 246-249.
18. Gélinas M, Juneau P, Gagné, F (2012) Early biochemical effects of *Microcystis aeruginosa* extracts on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 161 261–267.
19. Bouvy, M.; Falcão, D.; Marinho, M.; Pagano, M. and Moura, A. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 285-297.
20. Scheffer, M. 1998. Ecology of shaloo lakes. Chapman and Hall, London.
21. McDonald, M. E. (1985)b. Growth of a grazing phytoplanktivorous fish and growth enhancement of the grazed algae. *Oecologia* 67: 132-136.
22. Northcott, M.E.; Beveridge, M.C.M. & Ross, L.G. (1991). A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of tilapia, *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue-green algae. *Environmental Biology of Fishes* 31: 75-85.
23. Dempster, P.W.; Beveridge, M.C.M. & Baird, D.J. (1993). Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates on phytoplankton and periphyton. *Journal of Fish Biology* 43: 385-392.
24. Beveridge et al. (1993); (1991) Beveridge, M. C. M., D. J. Baird, S. M. Rahmattullah, L. A. Lawton, K. A. Beattie & G. A. Codd. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 43: 901-907
25. Keshavanath et al. (1994); Keshavanath, P.; Beveridge, M.C.M.; Baird, D.J.; Lawton, L.A.; Nimmo, A. & Codd, G.A. 1994. The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Fish Biology* 45: 123-129.
26. Robinson, R.L.; Turner, G.F.; Grimm, A.S. & Pitcher, T.J. (1995). An experimental study of phytoplankton feeding in three tilapia cichlids. *Journal of Fish Biology* 46: 449-456.
27. Turker, H. & Eversole, A.G.; Brune, D.E. (2003)a. Filtration of Green Algae and Cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. *Aquaculture* 213: 93-101.
28. Turker, H.; Eversole, A.G. & Brune, D.E. (2003)b. Comparative Nile tilapia and silver carp filtration rates of Partitioned Aquaculture System phytoplankton. *Aquaculture* 220: 449-457.
29. Panosso, R. Costa, I.A.S., Souza, N.R., Athayde, J.L., Cunha, S.R.S., Gomes, F.C.F. (2007). Cianobactérias e Cianotóxicas em Reservatório do Estado Rio Grande do Norte e o Potencial de Controle das Florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecol. Brazil.* 11(3): 433-449.
30. Beveridge, M.C.M., Briggs, M.R.P., Mowat, A., Northcott, M.E. & Ross, L.G., (1988). The function of micro branchios pines in Tilapia. *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture.* 311-317.
31. Meschiatti, A. J. Alimentação de comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi – Guaçu, SP. *Acta Limnologica Brasiliensia.* Botucatu, v.7, p.115-137, (1995).
32. Aguiaro, T.; Caramaschi, E. P. Trophic guilds in fish assemblages in three coastal lagoons of Rio de Janeiro State (Brazil). *Ver. Int. Ver. Limnol.*, v. 2166–2169, (1998).

33. Zhao, Z., Dong, S., Wang, F., Tian, X., Gao (2011). The measurements of filtering parameters under breathing and feeding of filter-feeding silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Aquaculture* 319: 178–183.
34. Funari, E.; Testai, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit.Rev. Toxicol.* (2008) 38: 97–125.
35. Sticca, S. C., Wisniewski, M. J. S., Pompeu, P. S. Estudo da variação da dieta das espécies *Geophagus brasiliensis* e *Astyanax scabripinnis* (pisces, cichlidae/characidae) relacionada a conservação dos correços dos aflitos e ferradura, alfenas - MG. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de (2009), São Lourenço – MG.
36. Dantas, E.W.; Moura, A.N.; Bittencourt-Oliveira, M.C. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *An.Acad.Bras.Cienc.* (2011) 83: 1327–1338.
37. Aslter, A., Kaplan-Levy, R.N., Sukenik, A. & Zohary, T., (2010). Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean Lake. *Hydrobiologia* 639: 115–128.
38. Malbrouck, C, Kestemont, P (2006) Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 72–86.
39. Pillar, V.D. (1997) Multivariate exploratory analysis and randomization testing with MULTIV. *Coenoses* 12: 145-148.

5. CAPÍTULO 2

Formatado de acordo com as normas do periódico *Ecotoxicology*.

Avaliação do Balanço Oxidativo em Ciclídeos com Potencial para Controle Biológico de Cianobactérias

Daniela Motta Failace¹, Bibiana Kaiser Dutra^{3*}, Lucia Ribeiro Rodrigues² & David da Motta-Marques^{1,2}

1-Programa de Pós-Graduação em Ecologia- UFRGS- Porto Alegre, RS, Brasil.

2-Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos - IPH/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3- Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (FEPAM/RS) – Programa de Pesquisa – Divisão de Biologia - Porto Alegre, RS, Brasil. *Bolsista de Pós-doutorado do CNPq.

dani.failace@yahoo.com.br

RESUMO

Cianobactérias podem produzir cianotoxinas que podem afetar uma gama de organismos nos ecossistemas aquáticos, além de comprometer a qualidade das águas destinadas a consumo humano. O presente estudo buscou avaliar experimentalmente mecanismos de dano e reparo enzimático das cianotoxinas de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre os peixes ciclídeos *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* através da análise dos níveis de lipoperoxidação e atividade de enzimas antioxidantes. Foram realizados 4 experimentos, compostos por peixes de duas classes de tamanho, agrupados em dois tratamentos (T1- Peixes de 5-10 cm; T2- Peixes de 10-15 cm) e três concentrações iniciais de cianobactérias (10 µg/l, 20 µg/l e 40 µg/l). Para avaliar os mecanismos de dano e reparo enzimático em *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* foram realizadas análises bioquímicas de lipoperoxidação (LPO), avaliando o dano oxidativo e análises de atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione-s-transferase (GST) no fígado e nas brânquias destes organismos. Os resultados revelaram como um padrão geral, que em ambas as espécies de ciclídeos avaliadas ocorreram alterações bioquímicas quando submetidos à ingestão de cianobactérias tóxicas, entretanto estes danos foram reparados pela ação das enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: Cianotoxinas, ciclídeos, biomarcadores, detoxificação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cyanobacterial blooms in water bodies are a worldwide problem caused by the anthropogenic activities. Cyanobacteria have considered toxic substances that can affect a diversity of organisms. This study objective to evaluate experimentally the effect of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* on *Geophagus brasiliensis* and *Oreochromis* sp. analyzing the lipoperoxidation level and activity of antioxidant enzymes of the specimens. Four experiments were conducted containing two sizes of cichlids (T1 fish 5-10 cm; T2- fish 10-15 cm) and three initial concentrations 10 µg/l, 20 µg/l e 40 µg/l of cyanobacteria cited above, the experiments lasted 96 hours. To evaluate the effects of these cyanotoxins in these organisms the following biochemical analyzes in liver and gills were performed: lipoperoxidation (LPO), evaluating oxidative damage, and the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), and glutathione-s-transferase (GST). The present study revealed a general pattern that both species of cichlids showed some biochemical changes when subjected to cyanotoxins tested here and in the time of experiment does not appear to cause permanent damage, as these appear to have been corrected by antioxidant enzymes.

Key-words: Cyanotoxins, cichlids, biomarker, detoxification, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de florações de cianobactérias em lagos e reservatórios é um problema mundial associado ao processo de eutrofização decorrente principalmente de atividades antropogênicas associadas ao uso e ocupação do solo (Gélinas, et al., 2011). Florações de cianobactérias acarretam sérios impactos sobre os ecossistemas aquáticos (Paskerová et al., 2012). Os impactos decorrentes das florações na biota podem ser considerados como um efeito interativo da ação das cianotoxinas, potencialmente produzidas durante as florações, com os fatores bióticos e abióticos do ambiente (Yu et al. 2011).

Cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com sua ação e composição: mecanismo de ação no organismo (hepatotóxicas ou neurotóxicas) e classificação em termos de estrutura química. Considerando os mecanismos de ação, as cianotoxinas de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* são classificadas como hepatotóxicas, porém quanto sua classificação química, microcistina é um hepapetídio cíclico e cilindrospermopsina, um alcalóide guanidínico, conforme a revisão de Zanchett &

Oliveira-Filho (2013), podendo influenciar o metabolismo dos organismos aquáticos de forma diferenciada.

O efeito de cianotoxinas, através do uso de marcadores bioquímicos, tem sido avaliado em peixes, conforme estudos de Pietro et al. (2007), Li et al. (2007) e Li et al., 2003. A exposição a cianotoxinas pode desencadear no organismo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a um quadro de estresse oxidativo. Entretanto, tal situação pode ser compensada pela ação de enzimas que atuam na detoxificação das EROs (Livingstone, et al. 2003). A ação deste sistema de dano e reparo enzimático pode variar conforme o tempo de exposição, a dose aplicada, os tecidos analisados e as espécies submetidas às cianotoxinas, de acordo com a recente revisão de Paskerová et al. (2012).

Os peixes ciclídeos *Oreochromis* sp. (tilápia) e *Geophagus brasiliensis* (cará) são potenciais controladores biológicos das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, conforme estudo de Failace et al. (2013). De acordo com a revisão de Malbrouck & Kestemont (2006), a exposição de peixes em fases iniciais de desenvolvimento a microcistinas pode afetar diretamente seu desenvolvimento embrionário, suas taxas de sobrevivência e desenvolvimento, como também causar alterações morfológicas. Portanto, um potencial organismo controlador biológico efetivo não pode apresentar um quadro de estresse oxidativo, sendo necessária a manutenção do balanço oxidativo nestes organismos como garantia de ausência de prejuízos às populações no ambiente natural ou possibilidade de bioacumulação através da cadeia trófica.

Neste sentido, o presente estudo avaliou mecanismos de ação enzimático de dano e reparo em *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* quando submetidos experimentalmente à ingestão/filtração das cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos-teste e cianobactérias utilizadas dos experimentos

Exemplares de *Oreochromis* sp. foram obtidos em um criatório tanque-rede localizado a 70 km de Porto Alegre, RS, e exemplares de *Geophagus brasiliensis* foram coletados na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS) distante 30 km Porto Alegre, RS.

As cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (NPLJ4) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (T3) foram obtidas do banco de cultura próprio do laboratório de Ecotecnologia e Limnologia Aplicada, no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da UFRGS, Porto

Alegre, RS e são mantidos através de repiques periódicos, utilizando meio de cultura ASM-1 (Gorham et al., 1964).

Delineamento experimental, parâmetros analisados e metodologia analítica

Experimentos utilizando *Oreochromis* sp. foram realizados no verão de 2013 e com *Geophagus brasiliensis*, no verão de 2014. Estes experimentos avaliaram as taxas de ingestão/filtração das cianobactérias tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis* sp. . Os peixes utilizados nos experimentos foram previamente aclimatados em aquários em condições controladas de luz e temperatura ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR em um ciclo de 12:12 (12 horas/claro, 12 horas/escuro) a 25 °C) e a disponibilidade de oxigênio avaliada a cada 48h. O período de aclimação foi 48h, sendo que os peixes foram privados de alimentação 24 horas antes do início do experimento.

Foram determinados nove tratamentos em triplicatas compostos por peixes de duas classes de tamanho, três concentrações de cianobactérias nas concentrações iniciais 40 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$, e controles de ambas as classes de tamanho não submetidos à ingestão/filtração de cianobactérias conforme segue:

- Cianobactérias (40 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (40 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Cianobactérias (20 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (20 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Cianobactérias (10 $\mu\text{g/L}$) + peixe (5 – 10 cm)
- Cianobactérias (10 $\mu\text{g/L}$) + peixe (10 – 15 cm)
- Controle tratamento 1 (sem inoculo de cianobactérias) + peixe (5 – 10 cm)
- Controle tratamento 2 (sem inoculo de cianobactérias) + peixe (10 – 15 cm)
- Controle ambiental (exemplares coletados e não submetidos ao teste)

O tratamento 1 (T1) foi composto por peixes de 5-10 cm, enquanto que o tratamento 2 (T2) foi composto por peixes de 10-15cm. Foram realizados quatro experimentos; experimento 1 (E1), avaliando a ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* por *Oreochromis* sp. (N=60); experimento 2 (E2), avaliando a ingestão/filtração de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp (N=60).; experimento 3 (E3), avaliando a ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* por

Geophagus brasiliensis (N=60) e experimento 4 (E4), avaliando a ingestão/filtração de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Geophagus brasiliensis* (N=60).

Aquários-teste foram dispostos aleatoriamente e abastecidos com água tratada (2L) desclorada e com aeração constante. Os exemplares utilizados nos experimentos foram medidos, pesados e acondicionados em seu respectivo tratamento. O inóculo inicial de cianobactéria foi adicionado e em seguida quantificado através de fluorômetro Phyto-Pam®, expresso em µg/L. Análises da concentração de cianobactérias na água ocorreram a cada 24 horas durante 96h. Durante os experimentos os indivíduos controles receberam ração comercial *ad libitum*.

Ao final dos experimentos todos os exemplares foram crioanestesiados e dissecados para retirada do fígado e da brânquia, sendo realizado *pools* (amostra composta) a cada 3 exemplares dentro de cada tratamento. Os *pools* foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer -20°C até a posterior homogeneização dos tecidos.

Homogeneização dos tecidos

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 20mM, aliquotados em tubos criogênicos e armazenados em freezer a -20°C até a realização das análises bioquímicas. Todas as análises da etapa de homogeneização dos tecidos foram realizadas em triplicata.

Análises bioquímicas

As proteínas totais foram quantificadas através de kit comercial LABTEST (ref. 99-250) através de ensaio colorimétrico utilizando com albumina bovina como padrão. Os resultados foram expressos mg/dl. Os níveis de lipoperoxidação foram mensurados através da quantificação das substâncias reagentes ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de Buege & Aust (1978). Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína.

Foram mensuradas as atividades das seguintes enzimas antioxidantes catalase, medida conforme o protocolo de Boveris & Chance (1973), onde é quantificado o consumo exponencial do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 240nm e os resultados expressos em moles de H₂O₂/mg de proteína/minuto; e glutatona S-transferase, medida conforme Boyland & Chasseaud (1969), onde é quantificada a conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutatona reduzida (GSH) a 340nm e os resultados expressos em U/mg de proteína.

Análise estatística

Para avaliar as diferenças entre o dano oxidativo e o sistema de reparo (ação das enzimas antioxidantes) foram realizadas análises de variância (ANOVA *one-way*) com randomização, utilizando-se software Multiv versão 3.31b. A hipótese nula (H_0) testada foi de que não há diferença significativa entre as concentrações utilizadas em comparação ao controle ($\alpha=0,05$), sendo a probabilidade α calculada por 1000 interações (Pillar, 2006), usando a soma dos quadrados das distâncias euclidianas calculadas entre as amostras. Os contrastes foram usados para avaliar a diferenças entre os tratamentos.

RESULTADOS

Experimentos avaliando a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* sobre os ciclídeos

No experimento realizado avaliando o consumo de *Microcystis aeruginosa* por *Oreochromis* sp. (E1), análises da lipoperoxidação no fígado dos organismos-teste do T1 não mostraram significância ($p>0,05$), já no T2 evidenciou-se significância ($p=0,05$), visto que a concentração 10 $\mu\text{g/l}$ apresentou uma elevação de 1,39 em relação aos controles. Os níveis de lipoperoxidação no T1 nas brânquias dos organismos-teste apresentaram significância ($p=0,02$). A concentração 40 $\mu\text{g/l}$ obteve níveis de lipoperoxidação maiores do que nos controles e na concentração 20 $\mu\text{g/l}$; 1,84 e 1,46, respectivamente. Análise de lipoperoxidação nas brânquias dos organismos-teste do T2 não foi significativa ($p>0,05$), conforme valores das tabelas 1 e 2.

A atividade da enzima catalase (CAT) no fígado dos organismos-teste dos T1 e T2 não foi significativa ($p>0,05$). Nas brânquias, apenas o T2 apresentou significância ($p=0,03$), considerando que a concentração 20 $\mu\text{g/l}$ apresentou níveis inferiores de 5,95; 10,13 e 4,32 em relação aos controles e às concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (Tabela 1 e 2).

A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) nos organismos-teste dos T1 e T2 nos fígados não apresentou níveis significativos ($p>0,05$). Nas brânquias, nos organismos-teste do T1, a GST apresentou significância ($p=0,03$). A concentração 40 $\mu\text{g/l}$ obteve níveis 2,33 menores que em relação aos controles. No T2, as concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$ diferiram dos controles, apresentando níveis de GST 2,77 e 3,61 menores. A concentração 40 $\mu\text{g/l}$ obteve níveis 2,15 menores que a concentração de 20 $\mu\text{g/l}$ (Tabela 1 e 2).

No experimento realizado avaliando as taxas de ingestão/filtração de *Microcystis aeruginosa* por *Geophagus brasiliensis* (E3), os níveis de lipoperoxidação no fígado dos

organismos-teste do T1 não apresentaram significância ($p>0,05$), enquanto que no T2 foi identificada significância ($p=0,001$), visto que a concentração 40 $\mu\text{g/l}$ obteve níveis de lipoperoxidação 6,20; 2,34 e 2,71 menores em relação aos controles, concentração 10 $\mu\text{g/l}$ e 20 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

Nas brânquias dos organismos-teste do T1, não foi observada significância ($p>0,05$), enquanto que o T2 foi obtida significância ($p=0,001$), considerando que as concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$ mostraram níveis de lipoperoxidação 2,12 e 2,45 menores do que os obtidos nos controles, respectivamente (Tabela 1e 2).

A atividade da enzima catalase no fígado dos organismos-teste do T1 e T2, não apresentou significância ($p>0,05$), porém os níveis desta enzima nas brânquias mostraram significância ($p<0,05$). No T1, as concentrações 10 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$ diferiram dos controles apresentando uma diminuição de 4,27; 6,39 e 3,97 , respectivamente, dos níveis de CAT. No T2, a concentração 20 $\mu\text{g/l}$ obteve níveis de 6,99 e 7,42 mais elevados do que nas concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$, respectivamente, (Tabela 1e 2).

A atividade da enzima glutathione S-transferase no fígado dos organismos-teste do T1 não mostrou significância ($p>0,05$), enquanto que no T2 a atividade da enzima foi significativa ($p=0,001$), visto que as concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 20 $\mu\text{g/l}$ apresentaram um decréscimo de 13,58 e 4,99 respectivamente, enquanto na concentração 40 $\mu\text{g/l}$ apresentou uma elevação de 5,04 em relação aos controles na atividade da GST.

A concentração 20 $\mu\text{g/l}$ apresentou uma elevação de 2,72 em relação a concentração 10 $\mu\text{g/l}$, já na concentração 40 $\mu\text{g/l}$ os níveis GST elevaram-se para 68,49 e 25,16 quando comparadas às concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 20 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. A atividade da GST nas brânquias de *Geophagus brasiliensis* quando submetidos à ingestão da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* não foi significativa em ambos os tratamentos ($p>0,05$) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) no fígado de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Microcystis aeruginosa*.

Fígado		LPO	CAT	GST	
Controles	T1	0,64±0,43	3,02±3,38	1826,95±2201,71	
	T2	1,27±0,48	7,93±9,76	832,75±461,08	
E1	T1	10 µg/l	0,28±0,11	7,29±5,50	2978,81±2373,42
		20 µg/l	0,49±0,37	4,23±3,31	5371,06±3523,10
		40µg/l	1,07±0,80	3,24±2,74	2886,64±1857,87
	T2	10 µg/l	1,76±0,69 *	12,62±9,76	1245,15±1309,42
		20 µg/l	2,06±0,61	35,56±37,63	135,95±94,60
		40µg/l	1,45±0,43	22,86±11,88	1181,95±474,47
Controles	T1	10,23±5,70	55,24±33,51	44,96±58,89	
	T2	10,23±13,23	57,13±27,96	38,44±70,07	
E3	T1	10 µg/l	9,93±5,69	55,95±21,31	1,41±0,48
		20 µg/l	12,49±4,66	54,60±38,54	179,74±214,95
		40µg/l	4,06±1,52	59,36±18,41	3,95±1,72
	T2	10 µg/l	7,65±2,46 +	70,42±11,85	2,83±1,36 +
		20 µg/l	8,86±2,21 +	72,88±28,37	7,70±3,07 *+
		40µg/l	3,26±0,37 *	58,20±40,16	193,89±79,45 *+

Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutathione-s-Transferase (GST) nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Microcystis aeruginosa*.

Brânquias		LPO	CAT	GST	
Controles	T1	1,11±0,27	2,06±1,19	1899,92±1371,76	
	E1	T2	1,45±0,59	4,95±4,82	1978,56±1389,98
E1	T1	10 µg/l	1,32±0,23	4,38±0,54	895,13±402,60
		20 µg/l	1,40±0,41	4,73±2,19	1122,71±749,80
		40µg/l	2,04±0,48 *	6,24±6,74	814,20±777,82 *
	T2	10 µg/l	1,71±0,24	8,43±3,54 +	715,25±567,59 *
		20 µg/l	1,70±0,55	0,83±0,21 *	1178,95±513,01* +
		40µg/l	2,67±1,45	3,59±1,06 +	547,38±213,77 *+
Controles	T1	461,80±145,04	336,63±502,84	1,11±0,57	
	E3	T2	679,99±238,78	116,72±127,26	0,83±0,40
E3	T1	10 µg/l	310,63±174,34	78,79±28,33*	0,52±0,08
		20 µg/l	457,70±86,75	52,68±30,93*	1,10±0,35
		40µg/l	287,85±79,31	85,01±52,72*	1,09±0,34
	T2	10 µg/l	320,11±111,15 *	68,32±24,45	1,41±0,35
		20 µg/l	363,87±52,50	477,39±257,46 +	1,42±0,97
		40µg/l	277,66±83,66 *	64,30±40,59	0,97±0,58

Experimentos avaliando a toxicidade de *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre os ciclídeos

No experimento avaliando o consumo de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Oreochromis* sp. (E2), a análise de lipoperoxidação mensurada no fígado dos organismos-teste do T1 apresentou significância ($p=0,01$), considerando que a concentração 40 $\mu\text{g/l}$ apresentou níveis de lipoperoxidação 2,37; 1,64 e 1,39 maiores do que os valores obtidos nos controles e nas concentrações de 10 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$. O T2 apresentou não significância ($p=0,058$).

Os níveis de lipoperoxidação das brânquias dos organismos-teste do T1 mostraram-se significativos ($p=0,004$), considerando que as concentrações 20 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$ diferiram dos controles, apresentando níveis de lipoperoxidação 1,31 e 1,65 respectivamente mais elevados. Já a concentração 40 $\mu\text{g/l}$ obteve um aumento na lipoperoxidação de 1,50 em relação a concentração 10 $\mu\text{g/l}$. Análises de lipoperoxidação nas brânquias dos organismos-teste do T2 apresentaram significância ($p=0,002$), tendo em vista que todas as concentrações (10 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$) diferiram dos controles, evidenciando um aumento progressivo dos níveis de lipoperoxidação de 1,59; 1,69 e 1,92, respectivamente (Tabela 3 e 4).

Os níveis de atividade da enzima catalase (CAT) para o fígado dos organismos-teste do T1 não foram significativos ($p>0,05$). No T2 foi identificada significância ($p=0,01$), ocorrendo uma diminuição dos níveis de atividade da enzima nas concentrações 10 $\mu\text{g/l}$ e 20 $\mu\text{g/l}$ em relação aos controles. A atividade da enzima catalase na concentração 10 $\mu\text{g/l}$ diminuiu 13,13 e na concentração 20 $\mu\text{g/l}$ os níveis decaíram 1,63 em relação ao controle. A concentração 10 $\mu\text{g/l}$ diferiu das demais, a concentração de 20 $\mu\text{g/l}$ apresentou níveis 8,06 mais elevados e a concentração 40 $\mu\text{g/l}$ os níveis aumentaram 15,-04.

A atividade da CAT nas brânquias dos organismos-teste do T1 mostrou significância ($p=0,02$). Observou-se que na concentração 10 $\mu\text{g/l}$ os níveis da enzima aumentaram 1,12 em relação aos controles, enquanto nas concentrações 20 $\mu\text{g/l}$ e 40 $\mu\text{g/l}$ a atividade da enzima diminuiu 7,67 e 5,42, respectivamente, em relação a concentração 10 $\mu\text{g/l}$. Nos organismos-teste do T2, a atividade da enzima catalase não mostrou significância ($p>0,05$) (Tabela 3 e 4).

A atividade da enzima glutathiona-s-transferase (GST) no fígado dos organismos-teste do T1 não apresentou significância ($p>0,05$), enquanto que a enzima GST nos organismos-teste do T2 mostrou significância ($p=0,03$), considerando que a concentração 20 $\mu\text{g/l}$ e a concentração 40 $\mu\text{g/l}$ apresentaram níveis 4,02 e 2,06 respectivamente maiores

do que obtido nos controles. A concentração 40 µg/l apresentou níveis de atividade da GST 1,28 mais elevados que a concentração 10 µg/l.

Nas brânquias dos organismos-teste do T1 foi observada significância ($p=0,03$), considerando que a concentração 20 µg/l apresentou níveis de GST 4,40 menores do que os controles. Nos organismos-teste do T2, os níveis de GST foram significativos ($p=0,001$), visto que as concentrações 20 µg/l e 40 µg/l apresentaram níveis 8,52 e 8,28 menores que os controles, porém a concentração 10 µg/l apresentou níveis semelhantes aos controles e 2,34 maiores que a concentração 40 µg/l (Tabela 3 e 4).

No experimento realizado avaliando a ingestão de *Cylindrospermopsis raciborskii* por *Geophagus brasiliensis* (E4), os níveis de lipoperoxidação no fígado dos organismos-teste do T1 foram significativos ($p=0,01$), visto que as concentrações 10 µg/l e 40 µg/l apresentaram níveis de lipoperoxidação 1,12 e 1,13 respectivamente mais elevados do que nos controles. O T2 observou-se significância ($p=0,001$), sendo que a concentração 40 µg/l obteve níveis de lipoperoxidação 1,55 menores em relação aos controles, enquanto as concentrações 10 µg/l e 20 µg/l obtiveram 1,72 e 1,61 menores em relação a concentração de 40 µg/l, respectivamente.

A análise de lipoperoxidação nas brânquias dos organismos-teste do T1 mostrou-se significativa ($p=0,002$), visto que as concentrações 20 µg/l e 40 µg/l apresentaram níveis 4,70 e 3,11 menores respectivamente do que os controles. A concentração 20 µg/l mostrou níveis 3,72 menores de lipoperoxidação em relação a concentração 10 µg/l. O T2 apresentou significância ($p=0,03$), considerando que a concentração 20 µg/l obteve níveis de lipoperoxidação 1,99 menores em relação aos controles, porém a concentração 40 µg/l mostrou níveis 1,89 mais elevados do que a concentração 20µg/l (Tabela 3 e 4).

A atividade da enzima catalase não apresentou variação significativa para as amostras do fígado nem para as brânquias dos organismos-teste dos T1 e T2 ($p>0,05$), vistos que os níveis desta enzima não sofreram alteração em relação aos controles nem entre os tratamentos (Tabela 3 e 4). Os níveis de atividade da enzima GST não apresentaram significância ($p>0,05$) para os organismos-teste dos T1 e T2 no fígado de exemplares de *Geophagus brasiliensis*. Análises nas brânquias apresentaram significância da atividade da enzima GST nos organismos-teste do T1 ($p=0,04$). As concentrações 10 µg/l e 20 µg/l apresentaram um aumento, respectivamente de 2,50 e 3,12 em relação ao controle e diferiram da concentração 40 µg/l que apresentou níveis da enzima GST similares aos controles. O T2 não apresentou níveis de atividade da enzima GST significativos ($p>0,05$) nas brânquias dos organismos-teste (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutaciona-s-Transferase (GST) no fígado de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Fígado		LPO	CAT	GST	
Controles	T1	1.83±0,55	25,83±11,71	545.94 ±356.64	
	E2	T2	1,87±0,76	19,16±15,47	513,29±381,20
E2	T1	10 µg/l	2.64±1.47	25.63±20.10	368.87±259.78
		20 µg/l	3.12±1.15	7.17±3.60	714.65±890.25
		40µg/l	4.33±0.07 * +	13.46±4.89	1329.71±1055.05
	T2	10 µg/l	3.15±0.81	1.46±0.56*	826.60±401.23
		20 µg/l	3.76±0.34	11.76±4.57*+	2026.78±384.59*
		40µg/l	3.07±1.42	21.94±19.38+	1055.21±1033.22*+
Controles	T1	120.67±42.42	1.52±1.17	144,14±65,95	
E4	T2	135.04± 27.54	1.09±0.30	124.48±74.71	
E4	T1	10 µg/l	135.52±16.86*	0.75±0.44	180,63±144,26
		20 µg/l	125.37±19.34	1.00±0.53	340,61±449,45
		40µg/l	136.13±13.41*	1.76±1.88	125,52±89,42
	T2	10 µg/l	149.48±13.96	0.83±0.29	109.39±146.45
		20 µg/l	139.71±22.77	0.72±0.36	99.75±58.08
		40µg/l	87.04±35.76* +	0.71±0.18	181.18±162.37

Tabela 4: Média e desvio padrão dos valores de lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST) nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* frente a ingestão de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Brânquias		LPO	CAT	GST	
Controles	T1	1,33 ± 0,24	10.96±11,17	2065,04±2187,04	
	T2				
E2	T2	1.21 ± 0.31	11.84±18.82	306,70 ± 163,78	
E2	T1	10 µg/l	1.46±0.40	12.29±10.30* +	647.18±311.46
		20 µg/l	1.74±0.16*	1.60±0.60	469.36±399.57 *
		40µg/l	2.19±0.42* +	2.27±1.92	1037.07±1505.69
	T2	10 µg/l	1.92±0.42*	4.27±4.22	533.58±215.21
		20 µg/l	2.04±0.50*	5.55±2.71	221.28±201.74*
		40µg/l	2.32±0.20*	2.24±1.55	227.84±108.58*+
Controles	T1	11,40±1.43	2.57±2.52	482.15±229,82	
	T2				
E4	T2	10.96±0,62	1.53±1.82	519.03±168.81	
E4	T1	10 µg/l	9.04±2.74	0.68±1.21	1207.75±816.00 *
		20 µg/l	2.43±1.10*+	0.38±0.21	1506.27±1219.78*
		40µg/l	3.67±3.64*	0.18±0.04	445.35±381.85 +
	T2	10 µg/l	6.53±4.50	1.39±2.67	757.66±272.16
		20 µg/l	5.50±2.17*	0.28±0.27	777.14±313.32
		40µg/l	10.40±1.63+	0.20±0.13	992.66±612.79

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar o sistema de defesas antioxidantes em peixes como *Danio rerio* (Wiegand et al., 1998; Best et al., 2002), *Cyprinus carpio* (Li et al., 2003), *Carassius auratus* e *Oreochromis* sp. frente ao consumo de *Microcystis aeruginosa*, porém todos estes estudos foram realizados considerando injeções intraperitoneais de microcistina, o que não refletem as condições ocorridas no ambiente natural, considerando o processo de ingestão de cianobactérias tóxicas (Li et al., 2007).

Considerando a exposição de peixes às cianotoxinas, embora um grande número de estudos mostrem a elevação dos níveis de lipoperoxidação (LPO) em animais expostos a microcistina, também existem estudos que indicam que a microcistina tem efeito antioxidante (Paskerová et al., 2012), como por exemplo para *Corydoras paleatus*, que

quando exposto à microcistina mostrou uma diminuição dos níveis de LPO nas brânquias (Cazenave et al. 2006). Também observou-se a ausência de alterações nos níveis de LPO conforme estudos de Blaha et al. (2004), utilizando *Hypophthalmichthys molitrix*, a carpa prateada; Li et al. (2005), avaliando a espécie *Misgurnus mizolepis* e Pietro et al. (2007), utilizando *Oreochromis niloticus*, a tilápia do Nilo.

Rymuszka et al. (2008) e Zanchett & Oliveira-Filho (2013) reportam em seus trabalhos de revisão, que o mecanismo de citotoxicidade da microcistina ainda não é completamente conhecido, contudo alguns estudos já verificaram a capacidade deste agente em alterar enzimas do metabolismo em diferentes modelos experimentais, bem como, aumentar o número de espécies reativas de oxigênio (Ding et al., 2000; Zegura et al., 2004, 2006; Bouaicha & Maatouk, 2004; Gehringer et al., 2004).

Embora a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes seja um importante parâmetro bioquímico para estudo em animais expostos a cianobactérias/cianotoxinas, os resultados obtidos a partir desta abordagem são bastante variados, havendo estudos onde as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), por exemplo, tem sua atividade estimulada e, conseqüentemente, aumentada; enquanto em outros estudos as mesmas enzimas encontram-se inibidas (Paskerová et al., 2012). Os mesmos autores comentam que em geral é esperado que enzimas de detoxificação, como a glutathione S-transferase (GST), tenham sua atividade aumentada, contudo em muitos estudos esta enzima não apresentou alterações ou até mesmo tem sua atividade inibida, sendo portanto um padrão de resposta variável de acordo com o organismo-teste avaliado, bem como com o tipo de cianotoxina e tecido analisado.

Ainda relacionado com a variabilidade nas respostas frente à exposição a cianotoxinas, estudos com invertebrados e peixes tem evidenciado a impotência da atividade da enzima GST no processo de detoxificação quando estes organismos são expostos a microcistina (Wiegand et al., 1998; Beattie et al., 2003; Pflugmacher, 2004; Pinho et al., 2005). Entretanto, Gélinas et al. (2011) analisando o fígado e cérebro da truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, exposta a extratos de *M. aeruginosa* verificou que os níveis de atividade da enzima GST foram aumentados, enquanto que os níveis de LPO permaneceram inalterados.

Li et al. (2007) analisando exemplares de *Hypophthalmichthys Molitrix* em ambiente natural durante períodos de floração da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* verificaram que a atividade das enzimas CAT, SOD, GST e glutathione peroxidase (GPX) aumentaram no fígado e nos rins durante a floração, porém decrescem assim que a florações

terminou. Segundo os autores, *M. aeruginosa* induziu o estresse oxidático e a atividade das enzimas antioxidantes que provavelmente trabalharam cooperativamente para eliminar as espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante a exposição à *M. aeruginosa*. No presente estudo os animais foram eutanaziados somente ao final do experimento, o que pode justificar os níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes inalterados em relação ao controle ou mais baixos, pois os danos ocorridos durante a exposição podem já ter sido reparados.

Jos et al. (2005) avaliando a performance de *Oreochromis* sp. exposto a repetidas doses da toxina de *M. aeruginosa* verificaram que a atividade das enzimas GPX, glutathione redutase (GR), SOD e CAT no fígado e nos rins dos organismos-teste foram significativamente elevadas. Resultado semelhante foi encontrado por Li et al. (2003) com a espécie *Cyprinus carpio*. Malbrouck & Kestemont (2006) descrevem em seu estudo que a diminuição dos níveis de glutathione no fígado na presença do aumento da lipoperoxidação, como ocorrido no presente trabalho quando *Oreochromis* sp. (T1 e T2) e *G. brasiliensis* (T1) ingeriram *Cylindrospermopsis raciborskii*. Este resultado sugere que a via de detoxificação das cianotoxinas nos organismos ocorre pela reação de conjugação da catalase e glutathione S-transferase, demonstrando a importância destas enzimas na eliminação das EROs para minimizar os danos causados ao fígado pelas cianotoxinas. Caso este mecanismo de reparação não ocorra com sucesso, os hepatócitos podem entrar em choque, sofrendo apoptose e até mesmo levando à necrose das células hepáticas.

Em estudo utilizando *Oreochromis niloticus*, Prieto et al. (2007) verificou que a atividade das enzimas GPX, GR, SOD e CAT diminuiu, enquanto a lipoperoxidação aumentou após a aplicação de doses de microcistina, 24h e 72h de tempo de experimento. Segundo os autores, é necessária uma exposição de longo período para ser observada a recuperação do sistema antioxidante através da resíntese de proteínas. Tal padrão de resposta corrobora com os dados encontrados no presente trabalho nas brânquias de *Oreochromis* sp. em ambos os tratamentos, quando ingerindo *C. raciborskii* e nas brânquias de *G. brasiliensis* em ambos os tratamentos, ingerindo *M. aeruginosa*.

No presente estudo, verificou-se o efeito das cianotoxinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* no balanço oxidativo (níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione S-transferase) no fígado e nas brânquias de *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis*. Como padrão geral foi observado que, embora ambas as espécies de ciclídeos tenham apresentado leves

alterações bioquímicas, estas cianotoxinas não parecem causar danos permanentes, pois tais alterações foram reparadas pela ação de enzimas antioxidantes.

Este padrão de resposta demonstra que um sistema de defesa antioxidante eficiente é um importante mecanismo para que estes animais corrijam os danos causados pelas cianotoxinas produzidas pelas cianobactérias em ambiente natural. Estes resultados permitem inferir que as espécies estudadas podem atuar como controladores biológicos em episódios de florações de cianobactérias sem sofrer algum prejuízo permanente/irreparável a sua população. Cabe ressaltar também, que é possível que as baixas concentrações de cianotoxinas utilizadas no presente estudo sejam bem toleradas pelos organismos-teste utilizados. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com acompanhamento de longo prazo para verificar se estas espécies conseguem manter o mesmo padrão de resposta antioxidante frente à contaminação crônica por cianobactérias/cianotoxinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Beattie, K A , Ressler, J, Wiegand, C , Krause, E., Codd, G A, Steinberg, C E ., Pflumacher, S. (2003) Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62, 219–226.

Best, J H, Pflugmacher, S, Wiegand, C, Eddy, F B, Metcalf, J S, Codd, G A (2002) Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 60, 223–231.

Blaha L, Babica P, Marsalek B (2009) Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdiscip Toxicol* 2(2):36–41.

Blaha L, Kopp R, Simkova K, Mares J (2004) Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Vet Brno* 73:477–482

Bouaicha, N, Maatouk, I (2004) Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 148, 53–63.

Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310

Boveris & Chance (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134(3): 707-716.

Boyland & Chasseaud, (1969). Glutathione S- Aralkyltransferase. *Biochem. J.* 115: 985-991.

Cazenave J, Bistoni M D A, Pesce S F, Wunderlin D A (2006) Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol* 76:1–12.

Ding W X, Shen H M, Ong C N (2000) Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32:547–555.

Failace, D M, Rodrigues, L R, Motta-Marques, D (2013) Avaliação experimental de processo de ingestão/filtração de *Oreochromis* sp. em relação às cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Anais Congresso Brasileiro de Limnologia, Bonito, MS, Brasil. Divulgação Meio Magnético.

Gehring, M M (2004) Microcystin-LR and okadaic acid cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 557, 1–8.

Gélinas M, Juneau P, Gagné, F (2012) Early biochemical effects of *Microcystis aeruginosa* extracts on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 161 261–267.

Gorham, P R.; Mclachlan, Z, Hammer, U T & Kim, W K (1964) Isolation and Culture of Toxic Strains of *Anabaena Flos-Aquae* (Lyngb.) De Bréb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 15: 796-804.

Jos, A, Pichardo, S, Prieto, A I, Repetto, G, Vazquez, C M, Moreno, I M, Camean, A M (2005) Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261–271.

Li, X, Lui, Y, Song, L, Liu, J (2003) Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol* 42, 85–89.

Li, L, Xie, P, Chen, J (2007) Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu lake China. *Toxicol* 49, 1042–1053.

Malbrouck, C, Kestemont, P (2006) Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 72–86.

Pinho, G L L, Rosa, M C, Maciel, F E, Bianchini, A., Yunes, J S, Proença, L A O, Monserrat, J (2005) Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotox. Environ. Saf.* 61, 353–360.

Paskerová H, Hilscherová K, Bláha, L (2012) Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. *Environ Sci Pollut Res* 19: 2024–2037.

Prieto, A I, Pichardo, S, Jos, A, Moreno, I M, Caméan, A M (2007) Time dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapiafish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 84, 337–345.

Pflugmacher, S, Wiegand, C, Oberemm, A, Beattie, K A, Krause, E, Codd, G, Steinberg, C E W (1998) Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.

Rymuszka, A, Sieroslawska, A, Bownik, A, Skowronski, T (2008) Immunotoxic potential of cyanotoxins on the immune system of fish. *Central European Journal of Immunology*, 33(3).

Wiegand C, Pflugmacher S, Oberemm A, Meems N, Beattie K A, Steinberg C E W, Codd G A (1998) Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 14:89–95.

Yu H, Xi B, Jiang J, Heaphy M J, Wang H (2011) Environmental heterogeneity analysis, assessment of trophic state and source identification in Chaohu Lake, China. *Environ Sci Pollut Res* 18 (8):1333–1342.

Zanchett, G, & Oliveira-Filho, E C (2013) Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins* 2013, 5, 1896-1917.

Zegura, B, Lah, T T, Filipic, M (2006) Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutation Research* 611, 25–33.

Zegura, B, Lah, T T, Filipic, M (2004) The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200, 59–68.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados inovadores em decorrência de alguns aspectos. Primeiro, a ocorrência do primeiro registro da presença de micro-espinhos branquiais em *Geophagus brasiliensis*, demonstrando que esta espécie de ciclídeo pode consumir cianobactérias, de acordo com as condições testadas. Tal estrutura em *Oreochromis* sp. já havia sido relatada em muitos estudos e está relacionada à retenção de pequenas partículas orgânicas, como fitoplâncton, em especial cianobactérias. Estas informações revelam que ambas as espécies de ciclídeos podem atuar como controladores (consumidores efetivos) de cianobactérias, de acordo com as espécies, concentrações e tempo testados.

O segundo aspecto relevante refere-se aos mecanismos de dano e reparo enzimático em organismos que tem sua dieta baseada na ingestão de cianobactérias produtoras de toxinas. Os resultados evidenciaram que *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* exerceram consumo efetivo de *Cylindrospermopsis raciborski*, porém os testes realizados avaliando a toxicidade da cianotoxina produzida por esta cianobactéria indicaram a ocorrência de dano enzimático (aumento dos níveis de lipoperoxidação (LPO)), principalmente nas brânquias dos organismos-testes utilizados nos experimentos em ambos os tratamentos. Por outro lado, ocorreu uma ação de reparação decorrente da atividade da enzima glutatona S-transferase, mantendo o balanço oxidativo. Nos experimentos realizados avaliando as taxas de consumo de *Microcystis aeruginosa* por *Oreochromis* sp. e *Geophagus brasiliensis* obtivemos, um consumo desta cianobactéria, mas em menores proporções, quando comparado com o obtido para *C. raciborski*. Os testes avaliando a toxicidade da cianotoxina de *M. aeruginosa* demonstraram que, em geral, não ocorreu um aumento nos níveis de LPO, nem tão pouco, um aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

Estes resultados representam importantes conhecimentos para o manejo e restauração de ecossistemas aquáticos eutrofizados baseado em interações de espécies, porém há a necessidade de estudos avaliando tanto uma exposição crônica (por um período de tempo mais prolongado do que o avaliado neste estudo) quanto uma exposição aguda (maiores concentrações de cianobactérias tóxicas), às cianotoxinas para verificar a manutenção do balanço oxidativo, permitindo, então, a validação destas espécies de ciclídeos como controladores biológicos efetivos de cianobactérias, sem prejuízo à manutenção das suas populações no ambiente natural.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- American Public Health Association (Apha). Eaton, A. D.; Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E. (Orgs.) 1999. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. 20ª Ed. Washington: American Public Health Association, Inc.
- Azevedo, S.M.F.O. 1998. Toxinas de Cianobactérias: causas para saúde pública. Medicina on line. 1(3): 1-22.
- Becker, Vanessa; Ihara, Priscila , Yunes, João Sarkis. Occurrence of anatoxin-a (s) during a bloom of *Anabaen acrasa* in a water-supply reservoir in southern Brazil Vanessa .J Appl Phycol. DOI 10.1007/s10811-009-9451-8.
- Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302-310.
- Beyruth, Z. 2000. Periodic disturbances, trophic gradient and phytoplankton characteristics related to Cyanobacterial growth in Guarapiranga Reservoir, São Paulo, Brazil. Hydrobiologia 424: 51 - 65.
- Beveridge, M. C. M., D. J. Baird, S. M. Rahmattullah, L. A. Lawton, K. A. Beattie & G. A. Codd. 1993. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmictys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biology 43:901-907.
- Bicudo, C.E.M.; Ramírez, R.J.J.; Tucci, A.; Bicudo, D.C. 1999. Dinâmica de populações fitoplanctônicas em ambiente eutrofizado: O Lago das Graças, São Paulo. In: Henry, R. (ed). Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos. Botucatu: FAPESP. pp. 451-507.
- Blomqvist, P.; Pettersson A. & Hyenstrand, P. 1994. Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems. Arch. Hydrobiologia 132: 141-164.
- Bouvy, M.; Falcão, D.; Marinho, M.; Pagano, M. and Moura, A. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during 1998 drought. Aquatic Microbial Ecology 20: 285-297.
- Boveris & Chance. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J.134(3): 707-716.
- Boyland and Chasseaud, 1969. Glutathione S- Aralkyltransferase. Biochem. J.115: 985-991.
- Cavalcanti , Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti. 2006. Potencial de cinco espécies de peixe como método de controle biológico de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório, no Ceará. Universidade Federal do Ceará Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Pública. Fortaleza, Ceará.
- Carmichael, W. W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Sci. Am. 270, 78–86. Caput Gelinas et. al., 2012. Caraco, N. & Miller, R. 1998. Direct and indirect effects of CO₂ on competition between a cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55:54-62.
- Carvalho, M.,C., Ciatoxinas. In: Manual ilustrado para identificação e contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. 2006. Editora Interciência, Engenho Novo, Rio de Janeiro, Brasil.

- Calijuri, M.C., Dos Santos, A. C. A. & Jati, S. 2002. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, S.P. - Brazil). *Journal of Plankton Research*, 24: 617 -634.
- Chorus, I. & Bartram, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on behalf of UNESCO, WHO and UNEP by E&FN Spon 2 -6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P. 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.* 21, 1-13.
- Dempster, P.W.; Beveridge, M.C.M. & Baird, D.J. 1993. Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates on phytoplankton and periphyton. *Journal of Fish Biology* 43: 385-392.
- Dempster, P.W.; Beveridge, M.C.M. & Baird, D.J. 1995. Can fish survive by filter feeding on microparticles Energy balance in tilapia grazing on algal suspensions. *Journal of Fish Biology*, 47, 7-17.
- Ganf, G.G. 1974. Diurnal mixing and the vertical distribution of phytoplankton in a shallow equatorial lake (Lake George) Uganda. *J. Ecology*, 62: 611 -629.
- Gelinas, M., Juneau, P., Gagné, F., 2012. Early Biochemical Effects of *Microcystis aeruginosa* Extracts on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 161: 261: 267.
- Gorham, P.R.; Mclachlan, J.; Hammer, U.T. & Kim, W.K. 1964. Isolation And Culture Of Toxic Strains Of *Anabaena Flos-Aquae* (Lyngb.) De Bréb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 15: 796-804.
- Huszar, V.L.M. & Caraco, N. 1998. The relationship between phytoplankton composition and physical-chemical variables: a comparison of taxonomic and morphological-functional approaches in six temperate lakes. *Freshwat. Biol.*, 40: 1-18.
- Huszar, V.L.M. & Silva, L.H. 1999. Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos. *Limnotemas* 2: 17p.
- Huszar, V. L. M.; Silva, L. H. S.; Marinho, M.; Domingos, P. and Anna, C. L. S. 2000. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424: 67-77.
- Huszar, V.L.M. 2003. A biodiversidade fitoplanctônica em uma nova abordagem para a predição de florações de cianobactérias em reservatórios do Estado do Rio de Janeiro. Projeto CNPq. 21p.
- Jensen, P., Jeppesen, E.; Orlík, K. & Kristensen, P. 1994 Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1692 -1699.
- Kaebnick, a. e Neilan, B. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production *FEMS . Microbiology Ecology*, 35: 1-9.
- Keshavanath, P.; Beveridge, M.C.M.; Baird, D.J.; Lawton, L.A.; Nimmo, A. & Codd, G.A. 1994. The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non -toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Fish Biology* 45: 123-129.

- Klein, B. A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livre. In: Estresse oxidativo, Norma Possa Marroni (org). 20002. Canoas : Editora da Ulbra, 16p.
- Krienitz, L., Kasprzak, P. & Koschel, R. 1996. Long term study on the influence of eutrofication, restoration and biomanipulation on the structure and development of phytoplankton communities in Feldberger Haussee (Baltic Lake District, Germany). *Hydrobiologia*, 330: 89-110.
- Lemes, Elis Mara, Garutti Valdener. Ecologia da ictiofauna de um córrego de cabeceira da bacia do alto rio Paraná, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 92(3):69-78, 30 de setembro de 2002
- caput Castro, R. M. C. & Casatti, L. 1997. the fish fauna from a small forest stream of the upper paraná river basin, southeastern brazil. *ichthyol. explor. freshwaters, münchen*, 7(4):337-352.
- Lleusuy, S.F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., Milei, S. 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and epiadrimicin im mice. *Tumor* 71, 241-249.
- Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T. 2002. The toxic effects of MC-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurinus mizolepis* Gunthe. *Toxicon* 40, 395-399.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminants-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 656-666.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 183, 265-275.
- Mackereth, F.J.H., Heron, J. and Talling, J.F. 1989. *Water Analysis: Some Revised Methods for Limnologists*.
- Mazzoni, R. e Iglesias- Rios, R. 2002. Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. *Journal of Fish Biology*. 61, 1606-1618
- McDonald, M. E. 1985a. Carbon budgets for a phytoplanktivorous fish fed three different unialgal populations. *Oecologia* 66: 246-249.
- McDonald, M. E. 1985b. Growth of a grazing phytoplanktivorous fish and growth enhancement of the grazed algae. *Oecologia* 67: 132-136.
- Mc Queen, D.J. & Lean, D.R.S. 1987. Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in lake St. George, Ontario. *Can. J. aquat. Sci.* 44: 598-604.
- Mirsa, H.P. & Fridovich. 1972. The role superoxide anion in the autoxidation of epinefrine and simple assay for superoxido dismutase. *J.J. bio. Chem.* 274 (10) 3170-3145.
- Molica, R.J.R.; Oliveira, E.J.A.; Carvalho, P.V.V.C; Costa, A.N.S.F.; Cunha, M.C.C.; Melo, G.L. & Azevedo, S. M. F. O. 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743-753.
- Northcott, M. E.; Beveridge, M.C.M. & Ross, L.G. 1991. A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of the tilapia, *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue-green algae. *Environmental Biology of Fishes* 31: 75-85.
- Panosso, R. Costa, I.A.S., Souza, N. R., Athayde, J. L., Cunha, S.R.S., Gomes, F.C.F. 2007. Cianobactérias e Cianotóxicas em Reservatório do Estado Rio Grande do Norte e o Potencial de Controle das Florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecol. Brasi.* 113: 433-449

- Pitelli, R.A.; Nachtigal, G.F.; Pitelli, R.L.C.M. Controle biológico de plantas daninhas. CBCPD, Brasília, 2005. 11 p.
- Panosso, Renata & Lurling, Miguel. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrosperopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *Journal of plankton research*, volume 32, 10, 1393 – 1404.
- Robinson, R.L.; Turner, G.F.; Grimm, A.S. & Pitcher, T.J. 1995. An experimental study of phytoplankton feeding in three tilapiine cichlids. *Journal of Fish Biology* 46: 449-456.
- Scheffer, M. 1998. Ecology of shallow lakes. Chapman and Hall, London.
- Smith, V. 1983. Low nitrogen to phosphorous ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221: 669-671.
- Smith, V. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat.* 43: 148-153.
- Shapiro, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case of the importance of CO₂ and pH. *Verh. Int. ver. Limnol.* 24: 38-54.
- Reynolds, C.S. 1987. Cyanobacterial water-blooms. In: J. Callow (ed). *Advances in botanical research*. Academic Press., London. pp: 67-143.
- Turker, H. & Eversole, A.G.; Brune, D.E. 2003a. Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. *Aquaculture* 213: 93-101.
- Turker, H.; Eversole, A.G. & Brune, D.E. 2003b. Comparative Nile tilapia and silver carp filtration rates of Partitioned Aquaculture System phytoplankton. *Aquaculture* 220: 449-457.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.*, Vol. (9): 1-38
- Von Sperling, M. 1996. Introdução a qualidade das águas e a o tratamento de esgotos - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Universidade Federal de Minas Gerais, v.1. 150p.
- Zevenboom, W. & Mur, L.R. 1980. N₂-fixing cyanobacteria: Why they do not become dominant in Dutch, hypertrophic lakes. *Develop. Hydrobiologia* 2: 123-130.
- Watson, S.B.; Mc Cauley, E. & Downing, J.A. 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.* 42: 487 -495.
- Wetzel, R. G.; Likens, G. E. 2000. *Limnological Analyses*. 3^a ed. Nova Iorque: Springer-Verlag. 429p.
- Xie, P., 2003. Silver Carp and Bighead, and their use in the Control of Algal Blooms in Chinese, with English Abstract. Science Press, Beijing, pp. 40–49.