

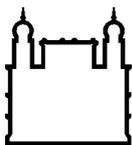
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

EFEITOS DA CIANOBACTÉRIA NEUROTÓXICA *Cylindrospermopsis
raciborskii* (WOLOSZYNSKA, 1912) SOBRE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Daphnia*
spp. (CRUSTACEA, CLADOCERA)

GABRIELE COSTA DOS REIS

Rio de Janeiro
Julho de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Gabriele Costa dos Reis

Efeitos da cianobactéria neurotóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) sobre parâmetros reprodutivos e comportamento alimentar de *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

Orientador: Dr. Aloysio da Silva Ferrão Filho

RIO DE JANEIRO

Julho de 2018

dos Reis, Gabriele Costa.

Efeitos da cianobactéria neurotóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) sobre parâmetros reprodutivos e comportamento alimentar de *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera) / Gabriele Costa dos Reis. - Rio de Janeiro, 2018.

xii, 53 f.; il.

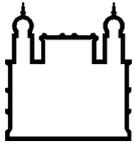
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2018.

Orientador: Aloysio da Silva Ferrão Filho.

Bibliografia: f. 43-53

1. Ecotoxicologia Aquática. 2. Ecologia de fitoplâncton-zooplâncton. 3. Cladóceros tropicais. 4. Cianotoxinas. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

GABRIELE COSTA DOS REIS

**Efeitos da cianobactéria neurotóxica *Cylindrospermopsis raciborskii*
(Woloszynska, 1912) sobre parâmetros reprodutivos e comportamento
alimentar de *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aloysio da Silva Ferrão Filho

Aprovada em: 05/07/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Darcílio F. Baptista - Membro titular do IOC – **Presidente.**

Prof. Dra. Dra. Renata Panosso - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Prof. Dra. Dra. Luciana Machado Rangel - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dra. Cláudia Portes Santos Silva – Membro Suplente do IOC.

Prof. Dr. Dra. Valéria Freitas de Magalhães -

Universidade Federal do Rio de Janeiro. Membro suplente.

Rio de Janeiro, 5 de julho de 2018

A minha madrinha Marta (*in memoriam*) e aos meus pais Manoel e Angela, por sempre serem os maiores incentivadores dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Aloysio, agradeço por oferecer a oportunidade de trabalhar com você, pela confiança depositada em mim e por todo incentivo científico desde a graduação até a realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental - IOC (FIOCRUZ): Diego, Taissa, Gustavo, Jéssica, Julia Rodrigues, Júlia Vianna e Michelle por fazerem todo o trabalho de rotina cansativo ser descontraído. Obrigada pela união que nos tornou uma família, vocês me ensinaram muito. Priscilla e Natália, obrigada pelos conselhos e almoços que salvaram meus dias.

A Ludmila por ser amiga, mãe e psicóloga nas horas vagas. Obrigada por me levar para almoçar, me dar caronas, me animar nos dias ruins, me orientar e estar presente sempre nesses dois anos.

A professora Sandra Azevedo e toda sua equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias - IBCCF (UFRJ) por me acolherem e fornecerem a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos. Thiago e Letícia, obrigada pelo apoio na manutenção das culturas e nos dias de experimento.

Ao Mauro, por toda orientação, disponibilidade e paciência nesse último ano. Obrigada por ir ao laboratório finais de semana, sair a noite do Fundão comigo e por toda sua dedicação para tornar esse trabalho possível.

Ao meu namorado e companheiro, Víctor. Por ser o primeiro a acreditar que eu conseguiria chegar até aqui, por me incentivar e dedicar atenção em compreender minha rotina de trabalho, mesmo longe, cansado e ocupado. Essa conquista é sua também.

A Lais e Luiz pela amizade, sessões de Netflix e por oferecerem abrigo nos dias de correria de disciplinas e experimentos. Lais, obrigada por se fazer presente em todos os momentos e por me entender sem precisar esforço algum.

A Tainara por sempre acreditar no meu potencial e me indicar o Programa de Pós-graduação do IOC. Você deu o primeiro passo nessa conquista! Muita gratidão por sua parceria e lealdade nesses anos.

As amigas que me incentivaram e tiveram paciência e interesse em tentar entender esse meu mundo louco de pesquisa: Dessa, Madu, Aluá, Lorena, Laryssa e Carol. Obrigada por acreditarem em mim!

A Isabela, Thayna, Jéssica, Natasha e suas famílias (Zezé, obrigada por todas as marmitas) que abriram as portas das suas casas e me acolheram nesse deslocamento diário de Petrópolis-Rio de Janeiro, não tenho como agradecer por todo o apoio e amor. Esse caminho teria sido muito mais difícil sem vocês.

A Mayara, obrigada por entender minha ausência e falta de tempo e não deixar de me apoiar nessa fase da minha vida.

Aos meus primos Alessandro e Beatrice pelas caronas para Fiocruz. Bia, obrigada pela companhia no trânsito e calor da Av. Brasil, pelas conversas e brincadeiras que faziam o trajeto ser menos estressante.

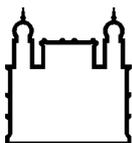
Ao Marcelo Manzi e ao Laboratório de Ecofisiologia de Algas - IBRAG (UERJ) por cederem a cepa CYLCAM-1 utilizada nesse trabalho.

Ao Darcílio, obrigada pela gentileza em revisar esse trabalho.

A Luciana Rangel e Renata Panosso por aceitarem participar da banca.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de mestrado.

E a Deus, por me sustentar por todo esse caminho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITOS DA CIANOBACTÉRIA NEUROTÓXICA *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Daphnia* spp. (CRUSTÁCEA, CLADOCERA)

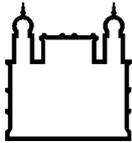
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Gabriele Costa dos Reis

Cianobactérias são produtoras de metabólitos secundários potencialmente tóxicos, conhecidos como cianotoxinas. Quando dominam ambientes aquáticos formando florações, causam grande impacto a saúde ambiental e humana, podendo inviabilizar o uso dos recursos hídricos. *Cylindrospermopsis raciborskii* vem sendo encontrada cada vez com maior frequência em ambientes aquáticos brasileiros. Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo analisar os efeitos de uma cepa de *C. raciborskii* (CYLCAM-1) produtora de saxitoxinas, no ciclo de vida e comportamento alimentar de espécies de *Daphnia* isoladas de ambientes aquáticos brasileiros (*D. laevis* e *D. gesneri*) e ambiente temperado (*D. similis*), investigando a tolerância a cianobactéria dos diferentes clones. Foram realizados os seguintes ensaios ecotoxicológicos: 1) Agudo com exposição a diferentes concentrações de *C. raciborskii* e biomassa fixa de clorófitas, minimizando efeitos de restrição alimentar, para avaliar o efeito sobre a mobilidade, a sobrevivência e a taxa de crescimento somático; 2) Crônico com diferentes concentrações de *C. raciborskii* e biomassa fixa de clorófitas, para avaliar os efeitos na taxa de crescimento somático e parâmetros reprodutivos como idade da primeira reprodução, fecundidade média, total de neonatos e taxa de aumento populacional (r); 3) Crônico com proporções variadas de clorófitas e *C. raciborskii* em um total de biomassa de 1,0 mg C L⁻¹ 4) Ensaios de herbivoria, com o objetivo de estimar as taxas de filtração (TF) de *Daphnia* quando exposta a diferentes dietas variando proporções de *C. raciborskii* e *S. capricornutum*. Os resultados demonstraram diferentes sensibilidades dos clones de *Daphnia* nos parâmetros analisados. Enquanto no ensaio crônico 1, *D. similis* foi afetada apresentando efeitos deletérios na sua sobrevivência, mobilidade, parâmetros reprodutivos e taxa de aumento populacional (r), no ensaio crônico com dietas de proporções variadas de clorófitas e cianobactéria, *D. gessneri*

apresentou mortalidade de todos os indivíduos nas dietas com 50% e 90% de CYLCAM-1, além de redução significativa em todos os parâmetros reprodutivos, apresentando inclusive taxa de aumento populacional (r) negativa na concentração de 90%. Foi observado também diferentes tolerâncias entre clones da mesma espécie, com *D. laevis* (Rio Doce) apresentando mais efeitos negativos sobre os parâmetros reprodutivos no ensaio crônico 1. No entanto, no ensaio crônico 2, os clones de *D. laevis* não apresentaram efeitos tão marcantes nesses parâmetros, sendo pouco afetados. Os ensaios de herbivoria demonstraram que *D. similis* e *D. laevis* (Rio Doce) não sofrem variação de suas taxas de filtração quando expostas a CYLCAM-1. Por outro lado, *D. laevis* (Ibirité) reduziu sua taxa de filtração total nos tratamentos de 50% e 90% e *D. gessneri* apresentou inibição da ingestão de CYLCAM-1, com taxa de filtração negativa no tratamento de 50% e 90%. O presente estudo demonstrou que espécies que apresentam uma alta herbivoria (*D. similis* e *D. laevis* (Rio Doce)), são menos tolerantes a exposição à CYLCAM-1, apresentando efeitos negativos no seu ciclo de vida. Enquanto clones com baixa herbivoria (*D. gessneri* e *D. laevis* (Ibirité)), são mais tolerantes e parecem coexistir com *C. raciborskii* em condições em que não ocorram dominância dessa cianobactéria.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECTS OF THE NEUROTOXIC CYANOBACTERIUM *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA, 1912) ON REPRODUCTIVE PARAMETERS AND FEEDING BEHAVIOR OF *Daphnia* spp. (CRUSTACEA, CLADOCERA)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Gabriele Costa dos Reis

Cyanobacteria are producers of potentially toxic secondary metabolites, known as cyanotoxins. When they dominate aquatic environments forming blooms, they cause great impact to the environmental and human health, being able to prevent the use of water resources. *Cylindrospermopsis raciborskii* has been found more and more frequently in Brazilian aquatic environments. In this context, this study aims to analyze the effects of a saxitoxin-producing strain of *C. raciborskii* (CYLCAM-1) on the life cycle and feeding behavior of *Daphnia* species isolated from Brazilian aquatic environments (*D. laevis* and *D. gesneri*) and temperate environment (*D. similis*), investigating the tolerance to cyanobacteria of the different clones. The following ecotoxicological tests were performed: 1) Acute with exposure to different concentrations of *C. raciborskii* and fixed chlorophyceous biomass, minimizing food restriction effects, to evaluate the effect on mobility, survival and somatic growth rate; 2) Chronic with different concentrations of *C. raciborskii* and fixed biomass of chlorophytes, to evaluate the effects on somatic growth rate and reproductive parameters such as age of first reproduction, mean fecundity, total neonates and population growth rate (r); 3) Chronic with varying proportions of chlorophytes and *C. raciborskii* in a total biomass of 1.0 mg C L^{-1} 4) Herbivory assays, with the objective of estimating *Daphnia* filtration rates (TF) when exposed to different diets varying ratios of *C. raciborskii* and *S. capricornutum*. The results showed different sensitivities of the *Daphnia* clones in the analyzed parameters. While *D. similis* was affected with deleterious effects on its survival, mobility, reproductive parameters and population increase rate (r), in the chronic trial with diets of varying proportions of chlorophytes and cyanobacteria, *D. gessneri* presented mortality of all individuals in the diets with 50% and 90% of CYLCAM-1, in addition to a significant reduction in all reproductive parameters, including a negative (90%) population increase rate. It was also observed different tolerances between clones of the same species, with *D.*

laevis (Rio Doce) showing more negative effects on the reproductive parameters in the chronic trial 1. However, in the chronic trial 2, the clones of *D. laevis* did not present as marked in these parameters, being little affected. Herbivory assays have demonstrated that *D. similis* and *D. laevis* (Rio Doce) do not suffer variation in their filtration rates when exposed to CYLCAM-1. On the other hand, *D. laevis* (Ibirité) reduced its total filtration rate in treatments of 50% and 90% and *D. gessneri* presented inhibition of the intake of CYLCAM-1, with a negative filtration rate in the treatment of 50% and 90%. The present study demonstrated that species with high herbivory (*D. similis* and *D. laevis* (Rio Doce)), are less tolerant to exposure to CYLCAM-1, with negative effects on their life cycle. While clones with low herbivory (*D. gessneri* and *D. laevis* (Ibirité)), they are more tolerant and appear to coexist with *C. raciborskii* in conditions where there is no dominance of this cyanobacterium.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Florações de cianobactérias e cianotoxinas	2
1.2 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	7
1.3 <i>Daphnia</i> : ecofisiologia e efeitos de cianobactérias	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.2 Ensaio ecotoxicológico agudo.....	13
3.3 Ensaios ecotoxicológicos crônicos.....	14
3.4 Experimento de herbivoria	15
3.5 Contagem de células e determinação da biomassa	15
3.6 Determinação e análise de STXs.....	16
3.7 Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A intensificação da industrialização, crescimento urbano e populacional associados a atividades agrícolas, aumentam o aporte de nutrientes nitrogenados e fosfatados em ecossistemas aquáticos, agravando o problema de eutrofização. Esse processo favorece o desenvolvimento de populações de algumas espécies fitoplanctônicas em detrimento de outras. Dentre as espécies do fitoplancton que aparecem nessas condições, estão as cianobactérias que podem ser produtoras de metabólitos secundários potencialmente tóxicos, denominados cianotoxinas. O crescimento acelerado desses organismos torna-se extremamente prejudicial tanto à saúde ambiental quanto à humana, além de trazer grande impacto social e econômico, podendo inviabilizar o uso dos recursos hídricos (Chorus e Bartram, 1999).

Dentre as cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii* é considerada uma espécie formadora de florações nocivas e vem sendo encontrada cada vez com maior frequência em ambientes aquáticos brasileiros, principalmente em reservatórios (Branco *et al.*, 1994; Bouvy *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 2000). Apesar de suas linhagens já terem sido descritas como produtoras de cilindrospermopsinas (CYN) e saxitoxinas (STXs), no Brasil a literatura descreveu até o presente apenas linhagens potencialmente produtoras de saxitoxinas.

As saxitoxinas são neurotoxinas que foram descritas pela primeira vez em moluscos marinhos que apresentaram paralisia, após se alimentarem de dinoflagelados que produziam essa cianotoxina. As saxitoxinas bloqueiam os canais de sódio da membrana do axônio impedindo a propagação do impulso nervoso (Chorus e Bartram, 1999).

Poucos estudos relatam os efeitos de cepas produtoras de saxitoxinas em organismos aquáticos de ambiente dulcícola. Os estudos existentes utilizando espécies de cladóceros, mostram que as espécies isoladas de ambientes diferentes respondem de maneira distinta as cepas de cianobactérias. O presente trabalho, tem como relevância avaliar pela primeira vez os efeitos de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYLCAM-1), produtora de saxitoxinas e isolada de um reservatório tropical (Reservatório do Camorim – Parque Estadual da Pedra

Branca – RJ) sobre espécies de *Daphnia* isoladas de ambientes tropicais brasileiros e um de origem temperada.

1.1 Florações de cianobactérias e cianotoxinas

Cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes que possuem clorofila-a e outros pigmentos acessórios como carotenoides e as ficobilinas (Raven *et al.*, 2005). Possuem uma história evolutiva de aproximadamente 3,5 bilhões de anos, sendo considerados os primeiros organismos fotossintéticos responsáveis pela oxigenação da atmosfera (Whitton e Potts, 2000). Podem se apresentar em formas unicelulares, filamentosas ou coloniais (Buratti *et al.*, 2017).

São organismos cosmopolitas, sendo encontrados em diferentes tipos de habitats doces, marinhos ou salobros. No entanto, são mais frequentes em água doce (Castro *et al.*, 2004; Granéli *et al.*, 2006). Quando dominam ecossistemas aquáticos em avançado estágio de eutrofização (O’Neil *et al.*, 2010), formam um fenômeno conhecido como floração de cianobactérias, sendo relatado em diversos ambientes aquáticos no mundo (Merel *et al.*, 2013). Essas florações são observadas quando ocorrem condições favoráveis como temperatura entre 15 e 30° C, abundância de luminosidade, águas com pH entre 6 e 9 e alta disponibilidade de nutrientes. São favorecidas por apresentarem vacúolos de gás, denominados de aerótopos que possibilitam flutuação na coluna d’água; acinetos, células formadas em condições desfavoráveis que acumulam substâncias de reserva em seu interior; heterocistos, células responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico e também por possuírem grande plasticidade fenotípica (Whitton e Potts, 2000; Bonilla *et al.*, 2012).

As cianobactérias que formam florações podem trazer efeitos prejudiciais ao ecossistema, seja através da produção de toxinas, depleção de oxigênio, sombreamento de habitats bentônicos ou na redução da eficiência da transferência de energia na cadeia trófica (Havens e Hudnel, 2008; Paerl e Huisman, 2008).

Os gêneros mais comuns de cianobactérias formadoras de florações são *Dolichospermum*, *Aphaizomenom*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Planktotrix* (Padisák e Reynolds, 2003). Dentre os aproximadamente 150 gêneros de

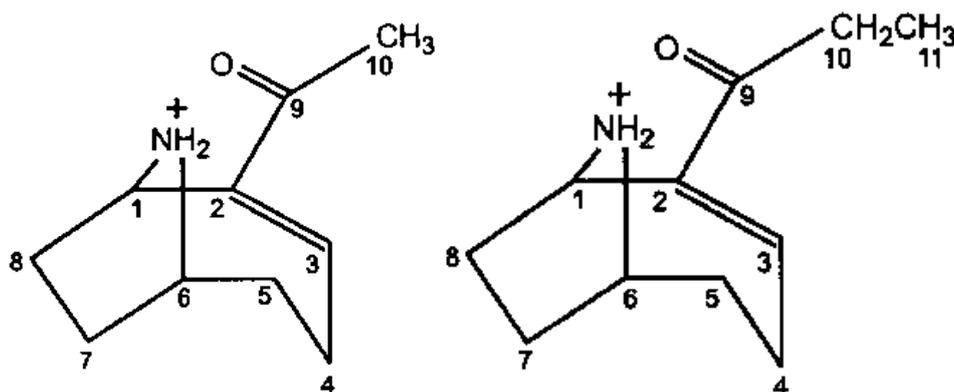
cianobactérias conhecidos, 40 estão relacionados com a produção de toxinas (Alperdoon *et al.*, 2007). No entanto, não se pode considerar que todas as florações de cianobactérias sejam tóxicas, algumas podem ser tóxicas durante um período devido à dinâmica de linhagens tóxicas e não tóxicas que compõem as florações (Molica e Azevedo, 2009). Algumas espécies de cianobactérias possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários denominados de cianotoxinas (Carmichael, 1992), que podem ser classificadas, de acordo com sua toxicidade em animais, em: hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), citotoxinas (cilindrospermopsinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a e anatoxina-a(s)) (Buratti *et al.*, 2017).

As hepatotoxinas consistem em peptídeos cíclicos, sendo as mais conhecidas as microcistinas, produzidas principalmente por gêneros de água doce como *Dolichospermum*, *Microcystis* e *Planktothrix*, e nodularina, produzida por uma espécie marinha, *Nodularia spumigena*. A cilindrospermopsina é um alcalóide guanidínico cíclico produzida principalmente pelo gênero *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon* (Ferrão-Filho, 2009). A nodularina e as microcistinas são consideradas inibidores de proteínas fosfatases 1 e 2A, enquanto que a cilindrospermopsina apresenta ação citotóxica e inibição da síntese de proteínas. As hepatotoxinas causam disfunções hepáticas agudas com hemorragia e morte do animal em poucas horas. Além de atuarem no fígado, podem alterar as funções de outros órgãos como rins, pulmão, timo e coração (Carmichael, 1992). Hepatotoxinas também podem causar efeitos de longo prazo, como a formação de tumores e incidência de câncer em populações expostas em período crônico a microcistinas e cilindrospermopsinas (Yu, 1989; Ueno *et al.*, 1996; Humpage e Fal Coner, 2003).

Na classe das neurotoxinas (Fig. 1) encontram-se organofosforados denominados anatoxina-a(s) e substâncias alcaloides, como a anatoxina, homoanotoxina e as saxitoxinas. A anatoxina-a e a homoanotoxina-a atuam como bloqueador neuromuscular pós-sinápticos, ligando-se ao receptor da acetilcolina e impedindo a transmissão do impulso neuromuscular (Carmichael, 1992) e foram isoladas a partir dos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* e *Planktothrix* (Landsberg, 2002). Já a anatoxina-a(s) é um organofosforado que se liga irreversivelmente a acetil-colinesterase, inibindo-a e impedindo que esta

degrade a acetilcolina (Henriksen *et al.*, 1997) sendo encontrada em *Dolichospermum spiroides* (Molica *et al.*, 2005).

As saxitoxinas (Fig. 2) atuam bloqueando canais de sódio nas células neuronais, impedindo a propagação do impulso nervoso (O'Neill *et al.* 2016). Constituem um grupo onde já foram identificados 57 análogos que variam em termos de toxicidade (Wiese *et al.*, 2010). Os principais gêneros de cianobactérias identificados como produtores de STXs são *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* e *Planktothrix* (Molica e Azevedo, 2009). São conhecidas como PST (*Paralytic Shellfish Toxins*), por seus efeitos terem sido primeiramente descritos em humanos envenenados após a ingestão de moluscos bivalves contaminados com toxinas de dinoflagelados marinhos (Landsberg, 2002). Bivalves se alimentam do fitoplâncton e são resistentes a essa toxina, acumulando grandes concentrações de PSTs. Devido a isso, são muito comuns os casos de intoxicação humana por ingestão de ostras e mexilhões contaminados por saxitotoxinas. Estima-se que ocorram 2000 casos de intoxicação em humanos por ano, com uma taxa de mortalidade de 15% no mundo (Pearson *et al.*, 2010). A maior epidemia atribuída a exposição às PSTs ocorreu em 1987, na Guatemala, com 187 vítimas e 26 indo a óbito (Rodrigue *et al.*, 1990).



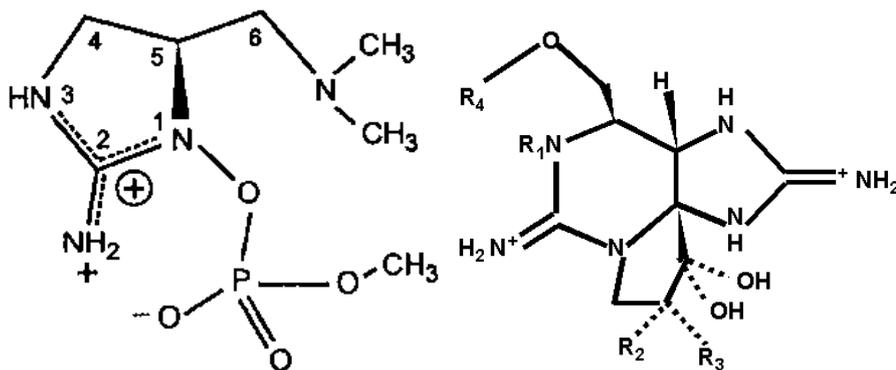
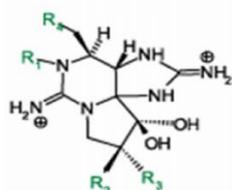


Figura 1. Estruturas químicas de neurotoxinas: (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) saxitoxinas (Chorus e Bartram, 1999; Ishimi *et al.*, 2001).



Toxina	Variação química			
	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	CONH ₂
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
Neo STX	OH	H	H	CONH ₂
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX6 (B2)	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻
dcSTX	H	H	H	H
dcneoSTX	OH	H	H	H
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H

Figura 2. Estrutura química da Saxitoxina e seus radicais. Alcalóides carbamatos não sulfatados, saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX); Alcalóides carbamatos monossulfatados, goniautoxina (GTX); Alcalóides carbamatos dissulfatados, toxina N-sulfocarbamail (C1-C4, GTX5 e GTX6); Derivados decarbamoil - toxinas decarbamoil (dcSTX, dcNeo e dcGTX1-4) (Diener *et al.*, 2006).

Os sintomas mais comuns por intoxicação de saxitoxinas são formigamento, sensação de ardência nos lábios, boca, dedos das mãos e dos pés se propagando para a extremidade dos braços, pernas e pescoço, fraqueza muscular no pescoço e nos membros com imobilidade, acompanhados por perda de coordenação, podendo ocorrer em alguns casos morte por parada respiratória. Os sintomas podem começar 5 minutos após a ingestão e a morte pode ocorrer de 2 a 12 horas (Branco *et al.*,

2006). A dose letal intraperitoneal em camundongos (DL₅₀) para saxitoxinas é de 10 µg/kg, enquanto que por consumo oral a DL₅₀ é de aproximadamente 263 µg/kg de peso corpóreo (Chorus e Bartram, 1999). O limite máximo aceitável de saxitoxinas em água para consumo humano é de 3,0 µg Equivalente STX/L, valor este adotado pela Portaria MS 2914/2011.

As cianotoxinas podem alterar a estrutura da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (Sivonen, 2000) e seus efeitos tóxicos já foram observados em peixes, crustáceos, zooplâncton e macrófitas (Christoffersen, 1996; Magalhães *et al.*, 2001; Ferrão-Filho *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004). Embora haja controvérsia sobre o papel ecológico das cianotoxinas, é fato que o zooplâncton é o primeiro a entrar em contato e sofrer os efeitos destas toxinas (Ferrão-Filho e Koslowsky-Suzuki, 2011). Apesar disso, toxinas sintetizadas por cianobactérias de água doce têm mostrado também efeitos letais nos organismos terrestres. Mortes de animais domésticos e silvestres, relacionadas com a água contaminada por cianotoxinas, são comuns em muitos países e têm sido registradas há mais de um século (Codd *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2008).

O primeiro caso confirmado de intoxicação aguda por cianotoxinas em humanos foi no Brasil, em uma clínica renal da cidade de Caruaru (PE) em 1996, onde 130 pacientes que faziam hemodiálise foram intoxicados por hepatotoxinas e desses pacientes, 76 vieram a óbito. As análises confirmaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsina no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica e de microcistinas em amostras de sangue e fígado dos pacientes (Carmichael *et al.*, 2001). Desde então, o interesse na investigação de cianotoxinas em água de abastecimento público tornou-se uma preocupação mundial. No Brasil, tem ocorrido um grande aumento de florações de cianobactérias produtoras de hepatotoxinas e neurotoxinas em vários mananciais brasileiros desde a região nordeste (Molica *et al.*, 2002), sudeste (Ferrão-Filho *et al.*, 2009) até a região sul do país (Lagos *et al.*, 1999; Yunes *et al.*, 2003), assumindo, portanto, importância do ponto de vista de saúde pública.

1.2 *Cylindropermopsis raciborskii*

Cylindropermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju é uma espécie de cianobactéria planctônica filamentosa e fixadora de nitrogênio, de água doce, pertencente à ordem Nostocales (Antunes *et al.*, 2015). Esta espécie foi descrita originalmente para a região tropical, mas atualmente vem formando florações também em ambientes temperados. Isto demonstra sua capacidade de adaptação e vantagem competitiva o que possibilitou uma rápida expansão em diferentes regiões do globo terrestre (Sant'Anna e Azevedo, 2000).

O sucesso dessa espécie deve-se a grande plasticidade fenotípica que permite tolerância a baixa luminosidade, habilidade de usar fontes internas de fósforo, capacidade de fixar nitrogênio, resistência à herbivoria, alta capacidade de dispersão, sobrevivência em ambientes salinos e habilidade para tolerar variações climáticas (Marinho e Huszar, 2002; Bouvy *et al.*, 2003; Briand *et al.*, 2004; Handee *et al.*, 2008; Bonilla *et al.*, 2012).

C. raciborskii possui grande potencial para produção de toxinas, possuindo cepas diversificadas em diferentes regiões geográficas (Rzymiski e Poniedzialek *et al.*, 2014), como também na mesma região (Chonudomkul *et al.*, 2004). Uma população pode ser constituída por cepas tóxicas e não tóxicas dentro do mesmo habitat, enquanto cepas tóxicas podem variar nos níveis de toxina sintetizada (Burford *et al.*, 2016).

Florações de *C. raciborskii* têm sido cada vez mais frequentes em reservatórios brasileiros o que torna esta espécie um dos mais importantes componentes das comunidades fitoplanctônicas (Branco e Senna, 1996; Branco e Cavalcanti, 1999; Bouvy *et al.*, 1999; Bouvy *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 2000). Cepas produtoras de cilindropermopsina (CYN) foram isoladas na Austrália e Nova Zelândia (Hawkins *et al.*, 1997; Wood e Stirling, 2003) e Ásia (Lei *et al.*, 2014). Contudo, cepas tóxicas isoladas de fontes brasileiras produzem neurotoxinas: saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX), goniautoxinas (GTX1-4), outros análogos de STX, além de outras toxinas não identificadas (Lagos *et al.*, 1999; Molica *et al.*, 2005; Pomati *et al.*, 2003; Ferrão-Filho *et al.*, 2007; Piccini *et al.*, 2011).

A ocorrência de *C. raciborskii*, produtora de saxitoxinas, em lagos e reservatórios brasileiros representa um risco para toda a comunidade de zooplâncton através da ingestão de células de cianobactérias ou absorção direta de toxinas dissolvidas na água (Costa, 2005). Em adicional, já foi observado que saxitoxinas produzidas por uma cepa isolada em reservatório brasileiro, tem difícil degradação e podem permanecer ativas até trinta dias a uma temperatura de 25°C e após cinquenta dias a uma temperatura de 19°C (Castro *et al.*, 2004), dificultando o tratamento da água para abastecimento público.

1.3 *Daphnia*: ecofisiologia e efeitos de cianobactérias

O gênero *Daphnia* pertence à ordem Cladocera (Crustacea), representando microcrustáceos que fazem parte do macrozooplâncton de água doce. Apresentam-se geralmente sob a forma de filtradores, se alimentando de algas, bactérias e outras partículas em suspensão (Rupert *et al.*, 1996).

A reprodução de *Daphnia* geralmente é assexuada, ocorrendo por partenogênese e originando uma população constituída apenas por fêmeas. Em condições ambientais desfavoráveis como superpopulação, falta de alimento ou mudanças de temperatura, pode ocorrer a produção de machos e reprodução sexuada, originando efípios. Essa estrutura abriga ovos de resistência que são resistentes à dessecação, capazes de resisitir durante muito tempo no sedimento, eclodindo meses ou anos depois (Storer *et al.*, 2002).

Os cladóceros possuem desenvolvimento direto e seu desenvolvimento pós-embrionário é dividido em ínstars. A primeira fase inclui o desenvolvimento e amadurecimento sexual do organismo, quando ocorre sua primeira reprodução. Na segunda fase, o indivíduo adulto continua a sofrer ecdise, atingindo outro ínstar. Cada ínstar é considerado como uma unidade fisiológica do ciclo de vida desses animais (Jaconetti, 2005).

Em ecossistemas eutróficos, estudos mostraram que a dominância de cianobactérias pode alterar a composição da comunidade zooplanctônica, que passa de uma comunidade dominada por filtradores generalistas de grande porte como *Daphnia*, para uma comunidade com dominância por organismos seletores de

pequeno porte como copépodos, rotíferos e representantes do protozooplâncton, como ciliados (Leonard e Pearl, 2005; Hansson *et al.*, 2007). Microcrustáceos ocupam um papel importante nos ecossistemas aquáticos, tanto como predadores de algas e bactérias como fonte de alimentação para peixes, aves e outros organismos (Fonseca, 1991; Dodson e Frey, 2001). Devido a essa posição trófica, esses organismos possuem um potencial de bioacumulação de cianotoxinas ao longo da cadeia alimentar aquática, podendo proporcionar uma via indireta para a exposição humana através do consumo peixes e macroinvertebrados (Negri e Jones, 1995).

As cianobactérias e suas toxinas podem exercer efeitos em todos os níveis taxonômicos, sendo que uma atenção especial tem sido dedicada aos efeitos sobre invertebrados aquáticos, principalmente o zooplâncton (Wiegand e Pflugmacher, 2005). Alguns efeitos sobre esses organismos são: redução da sobrevivência, da capacidade de filtração do alimento, dos movimentos natatórios e da fecundidade, o que pode levar a uma redução do *fitness* destas populações (Ferrão-Filho *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013; Rangel *et al.*, 2016; Ferrão-Filho *et al.*, 2017).

É de conhecimento que as cianobactérias afetam negativamente consumidores por apresentarem deficiência em nutrientes essenciais, tais como esteróis, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos ainda não identificados (DeMott e Müller-Navarra, 1997; Von Elert, 2003), além de causarem obstrução do aparelho filtrador e interferência mecânica por filamentos e colônias com o processo de filtração (Gliwicz e Siedlar, 1980) e pela produção de toxinas (Sarnelle *et al.*, 2010).

Além dos efeitos no ciclo de vida desses organismos, efeitos ecológicos como alterações comportamentais na distribuição vertical e horizontal na coluna d'água (Laurén-Mättä *et al.*, 1997) na composição da comunidade (Leonard e Pearl, 2005; Hansson *et al.*, 2007) e na atividade natatória de *Daphnia* (Ferrão-Filho *et al.*, 2014) na presença de cianobactérias já foram descritos.

Apesar dos efeitos deletérios observados, existem evidências de que estes efeitos são altamente variáveis entre os gêneros e espécies, e até mesmo entre clones da mesma espécie de zooplâncton (Okumura *et al.*, 2007). Portanto, deve-se

levar em consideração a resistência de uma espécie, podendo uma resistir aos efeitos tóxicos de cianobactérias mais do que outra (Nandini *et al.*, 2000).

Algumas características de *Daphnia*, como a reprodução partenogenética, a facilidade para o cultivo, corpo transparente (auxilia a observação do animal), curto tempo de desenvolvimento e sua alta taxa intrínseca de aumento populacional contribuem para estudos em laboratórios (Lynch, 1989). A maior parte do conhecimento ecológico desses organismos vem de regiões de clima temperado (Gilloly e Dodson, 2000). Espécies como *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* já são internacionalmente padronizadas para bioensaios. Por essa razão, é importante a padronização de um maior número de espécies nativas no Brasil, pois elas são mais representativas de ecossistemas tropicais, demonstrando respostas mais próximas da realidade desses ambientes (Ferrão-Filho, 2009).

A compreensão dos efeitos de cianobactérias em organismos zooplanctônicos como cladóceros do gênero *Daphnia* (Crustacea, Cladocera), que são filtradores generalistas e os primeiros a entrar em contato com cianobactérias, fornece uma importante ferramenta para se detectar a presença de florações tóxicas em reservatórios de abastecimento público (Herrera *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos tóxicos e nutricionais de uma cepa de cianobactéria da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYLCAM-1), isolada em um reservatório tropical brasileiro (Reservatório do Camorim – RJ) e produtora de saxitoxinas, no ciclo de vida e no comportamento alimentar de espécies de *Daphnia* isoladas de ambientes aquáticos brasileiros (*D. laevis* e *D. gessneri*) e ambiente temperado (*D. similis*), buscando investigar a tolerância desses clones a cepa CYLCAM-1.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar os efeitos agudos de *C. raciborskii* (CYLCAM-1) na mobilidade, sobrevivência e taxa de crescimento somático sobre *D. similis* e clones de *D. laevis*;
- 2- Avaliar os efeitos crônicos utilizando biomassa fixa de alimento nutritivo (clorofíceas) e variável de cianobactéria (CYLCAM-1), em parâmetros populacionais como sobrevivência, idade da primeira reprodução, total de neonatos, fecundidade média e taxa intrínseca de aumento populacional (r) sobre *D. similis*, *D. gessneri* e clones de *D. laevis*;
- 3- Avaliar os efeitos crônicos utilizando proporções variáveis de clorofíceas e de CYLCAM-1 em parâmetros populacionais como sobrevivência, idade da primeira reprodução, total de neonatos, fecundidade média e taxa intrínseca de aumento populacional (r) sobre *D. gessneri* e clones de *D. laevis*;
- 4- Avaliar a taxa de filtração (TF) de *D. similis*, *D. gessneri* e clones de *D. laevis* quando expostos à CYLCAM-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivos de cianobactérias, clorofíceas e *Daphnia*

Todas as culturas foram mantidas no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/FIOCRUZ) e no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC/UFRJ).

A cepa da espécie *C. raciborskii* (CYLCAM-1) foi isolada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia do Fitoplâncton (LabAlgas), Departamento de Biologia Vegetal (IBRAG/UERJ) de amostras coletadas no reservatório do Camorim, localizado na vertente sudeste do maciço da Pedra Branca, a 436 metros de altitude, integrando o Parque Estadual da Pedra Branca (PEPB) (INEPAC, 2006). A cepa CYLCAM-1 foi cultivada em meio WC (Guillard, 1975), com pH ajustado para 8,0 e as clorofíceas *Selenastrum capricornutum* Printz e *Ankistrodesmus falcatus* (Braun) utilizadas para alimentar os cladóceros, foram cultivadas em meio oligo (AFNOR, 1980) com pH ajustado para 7,0 e aeração constante. Ambas as culturas foram mantidas à temperatura de 23 ± 1 °C, com intensidade luminosa de $20-40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12/12 h.

Os clones de *Daphnia* utilizados como organismos-teste foram isolados de diferentes corpos hídricos brasileiros e um de ambiente temperado (Tabela 1). *D. similis* é considerada uma espécie padrão para testes ecotoxicológicos no Brasil, tendo protocolo padronizado pela NBR ABNT 12713/2004.

Tabela 1 – Espécies de *Daphnia* utilizadas nesse estudo.

Espécie	Tamanho adulto (mm)	Origem
<i>D. similis</i> ¹	$2,2 \pm 0,03$	Região temperada
<i>D. laevis</i>	$1,8 \pm 0,03$	Lagoa do Ibité-MG
<i>D. laevis</i>	$1,8 \pm 0,04$	Lagoa Jacaré-MG
<i>D. gessneri</i>	$1,92 \pm 0,03$	Reservatório do Apertado-BA

¹ Cedida pelo Labtox, Biorio, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

As culturas de cladóceros foram mantidas em béqueres de 1000 mL com meio artificial (Tollrian, 1993) pH ajustado para 7,5, combinado com 30% de água filtrada (tamanho do poro do filtro 1-2 μm) de tanques de decantação da estação de tratamento da CEDAE, dentro do PEPB, a $23,5 \pm 1$ ° C, sob baixa intensidade luminosa. Foi fornecida uma dieta com total de $0,4 \text{ mg C L}^{-1}$ de clorófitas (*S. capricornutum* + *A. falcatus*) e em adicional, um extrato de ácido húmico (Microbe Lift Amazon Black & Soft Water) a um volume de 0,5 ml/L para os animais.

3.2 Ensaio ecotoxicológico agudo

Um ensaio com o objetivo de mensurar os efeitos agudos sobre a mobilidade, sobrevivência e crescimento somático de *Daphnia* foi realizado no LAPSA/FIOCRUZ. Foram separados neonatos nascidos até 24 horas de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Lagoa do Ibirité) e *D. similis* e expostos a diferentes tratamentos contendo clorófitas (*S. capricornutum* + *A. falcatus*) e CYLCAM-1 com suspensão algal de 30 mL. Foram utilizados três tubos replicados para cada tratamento, cada um contendo dez recém-nascidos. As exposições consistiram em concentrações variáveis da cianobactéria (0,8, 1,6, 3,2 e 6,5 mg C L^{-1}), sendo a biomassa de clorófitas fixada em $0,4 \text{ mg C L}^{-1}$, com o objetivo de minimizar limitação nutricional. Também foi utilizado um grupo controle, que recebeu apenas as clorófitas na concentração de $0,4 \text{ mg C L}^{-1}$. O experimento durou 96 horas, a cada 24 horas o número de indivíduos vivos e móveis foram registrados e o meio de cultura renovado. Ao final do teste organismos sobreviventes de cada tratamento foram mensurados em lupa Olympus (SZ61) com aumento de 2X, para o cálculo da taxa de crescimento somático, obtido através da fórmula:

$$(\text{Ln } C_f) - (\text{Ln } C_i)/\Delta t$$

Onde C_i é o comprimento inicial, C_f é o comprimento final e t é o tempo do experimento em dias.

3.3 Ensaios ecotoxicológicos crônicos

Dois ensaios foram realizados com o objetivo de mensurar os efeitos da dieta de CYLCAM-1 na reprodução de *Daphnia*. Os ensaios ocorreram de duas maneiras: 1) Neonatos nascidos até 24 horas de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Ibirité), *D. gessneri* e *D. similis*, foram expostos em tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura com concentrações variáveis de CYLCAM-1 (0,5, 1,0 e 1,5 mg C L⁻¹) e um controle que recebeu apenas clorófitas. Assim como no ensaio agudo, os cladóceros receberam 0,4 mg C L⁻¹ de clorófitas como alimento nutritivo em todos os tratamentos.

2) Neonatos nascidos até 24 horas de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Ibirité) e *D. gessneri* foram expostos em tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura com concentrações variáveis de CYLCAM-1 e clorófitas, calculadas a partir de uma concentração total de 1,0 mg C L⁻¹ da seguinte maneira: 25% (0,25 mg C L⁻¹) de CYLCAM-1 + 75% (0,75 mg C L⁻¹) de clorófitas; 50% (0,5 mg C L⁻¹) de CYLCAM-1 + 50% (0,5 mg C L⁻¹) de clorófitas e 90% (0,9 mg C L⁻¹) de CYLCAM-1 + 10% (0,1 mg C L⁻¹) de clorófitas. O grupo controle recebeu apenas clorófitas (10% *S. capricornutum* + 90% *A. falcatus*). Nos dois ensaios, quinze tubos constituíram o número de réplicas para cada tratamento, com cada tubo contendo um neonato. Os meios de cultura foram renovados diariamente.

O ciclo de vida desses indivíduos foi acompanhado desde o estágio juvenil até a maturidade até pelo menos a terceira ninhada em cada espécie (15 dias), observando-se a idade da primeira reprodução (primípara) e o número de neonatos produzidos por fêmea em cada réplica. A sobrevivência (l_x) e a fecundidade média (m_x) foram utilizadas para o cálculo da taxa intrínseca de aumento populacional (r), através da utilização do programa Rm 2.0, que estima o valor médio de r por técnica de “Bootstrap” (Taberner *et al.*, 1993). Ao final do teste os organismos de cada tratamento foram medidos da mesma maneira que descrito para o ensaio agudo, para a estimativa da taxa de crescimento somático.

3.4 Experimento de herbivoria

O experimento de herbivoria consistiu na exposição de adultos de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Ibirité), *D. similis* e *D. gessneri* a 10 mL de proporções variadas de clorofíceas e CYLCAM-1 a uma concentração total de 1,0 mg C L⁻¹ (25% CYLCAM-1 e 75% *S. capricornutum*, 50% CYLCAM-1 e 50% *S. capricornutum*, 90% CYLCAM-1 e 10% *S. capricornutum*) e um tratamento com apenas clorofíceas (100% *S. capricornutum*). O ensaio adotou quatro tubos por tratamento, cada um contendo 2 indivíduos e também um controle sem animais para cada tratamento paralelamente. As proporções foram calculadas a partir de uma biomassa total de 1,0 mg C L⁻¹ e os animais utilizados não foram alimentados na véspera do ensaio.

Os organismos foram incubados no escuro durante 3 horas e posteriormente as taxas de filtração (TF, em mL ind⁻¹ h⁻¹) foram estimadas pelo fluorímetro PHYTO-PAM, através da diferença de fluorescência detectada nas concentrações de cianobactéria (sinal azul) e clorofíceas (sinal verde) em tratamentos com e sem animais (controle). As taxas de filtração foram calculadas usando a equação:

$$CR = \{\ln (Chla_{controle}) - \ln (Chla_{tratamento})\} / \Delta t \times V/N,$$

Onde, $Chla_{controle}$ é a concentração final no controle (sem animais), $Chla_{tratamento}$ é a concentração final nos tratamentos (com animais), Δt é o tempo de incubação (h), V é o volume de meio de cultura (mL) e N é o número de animais (Peters, 1984).

Foi realizada a análise da taxa de filtração do consumo da biomassa total (sinais de cianobactéria + clorofíceas) e da biomassa de ambas separadamente.

3.5 Contagem de células e determinação da biomassa

As células das clorofíceas *S. capricornutum* e *A. falcatus* e os filamentos da cepa da cianobactéria CYLCAM-1 (*C. raciborskii*) foram contados em câmara Fuchs-Rosenthal para a determinação da densidade celular (tricoma mL⁻¹). As dimensões (comprimento e largura) das células das clorofíceas e dos filamentos da cepa

CYLCAM-1 foram mensuradas em microscópio com auxílio do programa CellB. Foi realizado o cálculo do biovolume celular (Hillebrand *et al.*, 2002; Sun e Liu, 2003) a partir do qual foi estimada a biomassa em carbono (mg C L^{-1}) das suspensões de clorofíceas e cianobactérias (Rocha e Duncan, 1985).

3.6 Determinação e análise de STXs

A análise de saxitoxinas foi feita por ensaio de ELISA (Enzyme Linked Imunoabsorbent Assay) com o uso de kit de saxitoxinas da Beacon (Beacon Analytical Systems, Inc.).

3.7 Análise estatística

Para os cálculos de CL_{50} (Concentração Letal a 50% dos indivíduos) e CE_{50} (Concentração efetiva onde 50% da população exibe uma resposta) dos ensaios agudo e crônicos foi utilizada a plataforma online MOSAIC (Charles *et al.*, 2018).

Os parâmetros populacionais do ensaio crônico (idade da primeira reprodução, fecundidade e o número de neonatos produzidos por fêmea) e os dados do experimento de herbivoria foram analisados por ANOVA unidirecional e as diferenças entre tratamentos foram analisadas por Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. A taxa intrínseca de aumento populacional (r) foi analisada pelo teste t de Student ($p < 0,05$), utilizando o programa Primer 1.0.

4. RESULTADOS

No ensaio ecotoxicológico agudo as concentrações de saxitoxina variaram de 0,6 a 5,1 ng L⁻¹. No entanto, não houve efeitos significativos na sobrevivência e mobilidade da maioria dos cladóceros. Somente para *D. similis* houve mortalidade maior que 50% na concentração de 6,5 mg C L⁻¹ e foi possível calcular uma CL₅₀ de 6,8 (5,9-8,6) mg C L⁻¹ (Fig. 3). No entanto, foram observados efeitos significativos na taxa de crescimento somático para todas as espécies. *D. similis* sendo afetada desde as concentrações mais baixas de CYLCAM-1 ($p < 0,0001$), *D. laevis* (Rio Doce) e *D. laevis* (Ibirité) nas maiores concentrações $p = 0,0006$ e $p = 0,0002$, respectivamente (Fig. 4).

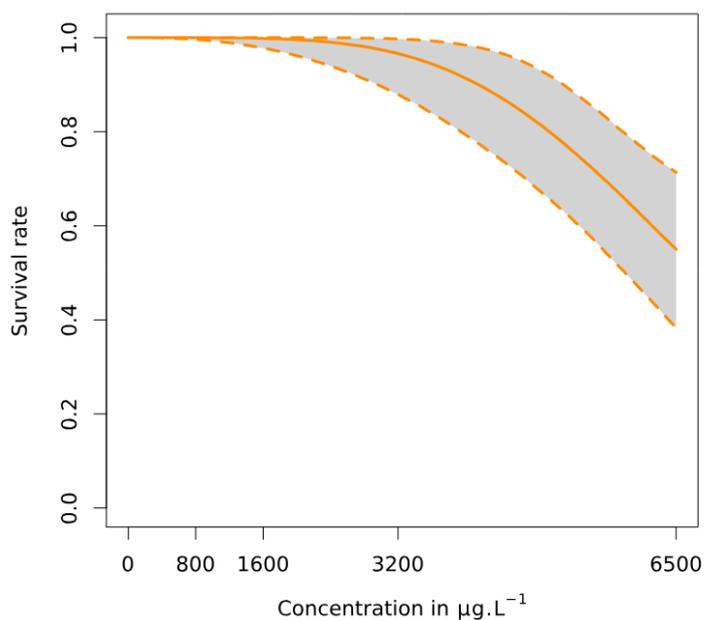


Figura 3. Curva de sobrevivência em função da concentração de carbono (µg L⁻¹) para *D. similis* em ensaio agudo. O valor de CL₅₀ e a curva foram gerados pela plataforma MOSAIC (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/mosaic/>).

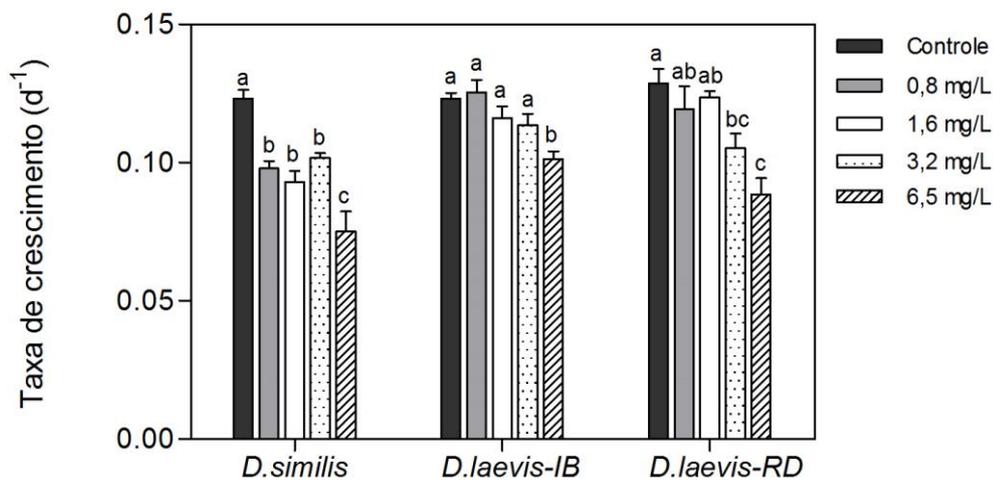


Figura 4. Taxa de crescimento somático de *D. similis*, *D. laevis* (Ibirité), *D. laevis* (Rio Doce) expostas à cepa CYLCAM-1 em ensaio agudo. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey $p < 0,05$).

No ensaio crônico com proporção fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e variadas de cianobactéria ($0,5$, $1,0$ e $1,5 \text{ mg C L}^{-1}$), os resultados mostraram efeitos significativos na taxa de crescimento somático de todas as espécies (Fig. 5).

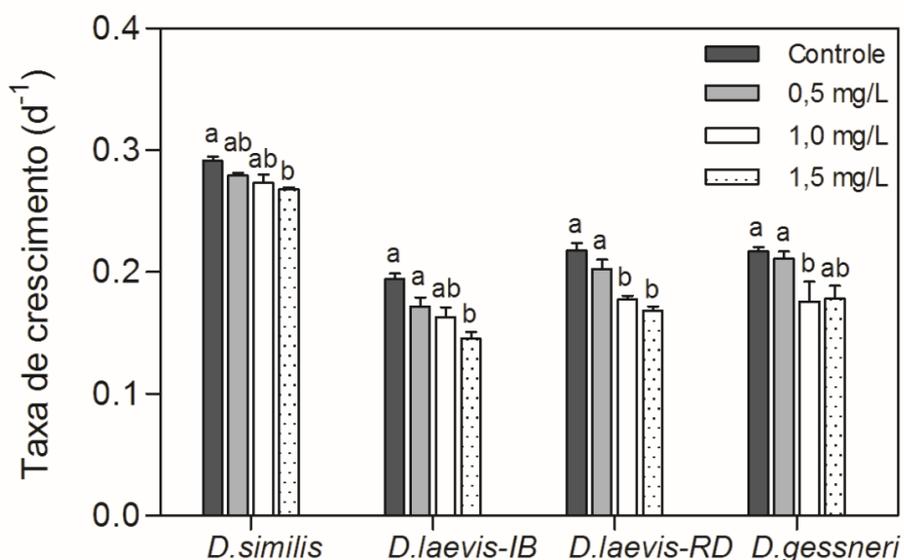


Figura 5. Taxa de crescimento somático de *D. similis*, *D. laevis* (Ibirité), *D. laevis* (Rio Doce) e *D. gessneri* expostas à concentração fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e variável de CYLCAM-1 em ensaio crônico. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey $p < 0,05$).

D. similis e *D. gessneri* apresentaram redução na sobrevivência (I_x) durante o experimento. No geral, as duas espécies foram mais afetadas na concentração de $1,5 \text{ mg C L}^{-1}$, com redução do número de indivíduos ao longo do ensaio (Fig. 6). Na concentração de $1,5 \text{ mg C L}^{-1}$, *D. similis* sofreu redução na taxa de sobrevivência de cerca de 67% no 15º dia (Fig. 6A). No entanto, *D. gessneri* sofreu redução da sobrevivência de cerca de 47% no 15º dia, nessa mesma concentração (Fig. 6B). As estimativas de CL_{50} (concentração que causa mortalidade de 50% dos indivíduos) e CE_{50} (concentração que afeta a reprodução de 50% dos indivíduos) podem ser observadas na Tabela 2. Não foram observados efeitos de CYLCAM-1 na sobrevivência dos clones de *D. laevis*.

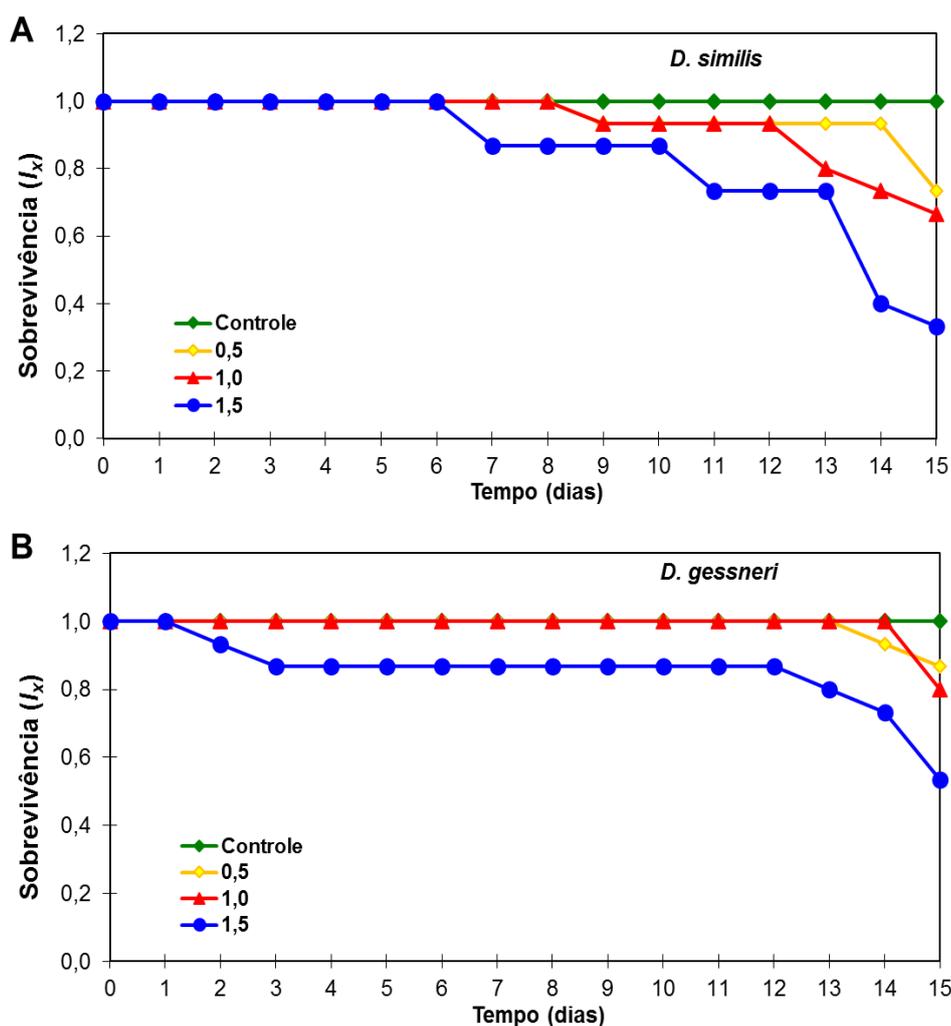


Figura 6. Sobrevivência (I_x) de A) *D. similis*; B) *D. gessneri* em função do tempo (dias) expostas à concentração fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e variável de CYLCAM-1 em ensaio crônico.

Tabela 2. Valores da CL_{50} e CE_{50} e intervalos de confiança de 95% de *D. similis*, *D. laevis* (Ibirité), *D. laevis* (Rio Doce) e *D. gessneri* expostas à concentração fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e variável de CYLCAM-1 em ensaio crônico. Os símbolos (-) indicam que não foi possível calcular as estimativas para a espécie.

Espécie	CL_{50} (mg C L^{-1})	CE_{50} (mg C L^{-1})
<i>D. similis</i>	0,98 (0,59 - 1,50)	1,26 (1,10 - 1,43)
<i>D. laevis</i> (Ibirité)	-	1,24 (1,02 - 1,52)
<i>D. laevis</i> (Rio Doce)	-	0,98 (0,82 - 1,21)
<i>D. gessneri</i>	1,33 (0,75 - 1,92)	1,68 (1,47 - 1,92)

A concentração STX variou de 1,5 a 4,5 ng L⁻¹ de neste ensaio, sendo observado certo grau de imobilidade em *D. similis*, *D. laevis* (Ibirité) e *D. laevis* (Rio Doce) (Fig. 7). *D. similis*, apresentou 13,3% dos organismos imobilizados no 4^o dia na concentração de 1,5 mg C L⁻¹, sofrendo uma recuperação nos dias seguintes. No entanto, no 10^o dia foi observada a imobilidade de 46,2% dos organismos e novamente no 13^o dia de 63,6%. Na concentração de 1,0 mg C L⁻¹, no 9^o dia 21,4% dos organismos ficaram imóveis e no 12^o dia todos imobilizaram (100%). Também ocorreu imobilidade dos movimentos natatórios na concentração de 0,5 mg L⁻¹, mas apenas no 14^o dia para 21,4% dos indivíduos (Fig. 7A). O clone *D. laevis* (Ibirité), apresentou imobilidade no primeiro dia de ensaio, com os organismos se recuperando apenas no 4^o dia na concentração de 1,5 mg C L⁻¹. A maior imobilidade foi observada na concentração de 1,0 mg C L⁻¹ com 40% dos organismos imóveis, seguida da concentração de 1,5 mg C L⁻¹ com 33,3% e da concentração de 0,5 mg C L⁻¹ com 21,4% (Fig. 7B). Por último, foi observado imobilidade de 14,3% dos organismos no 1^o dia na concentração de 0,5 e 1,0 mg C L⁻¹ em *D. laevis* (Rio Doce) (Fig. 7C).

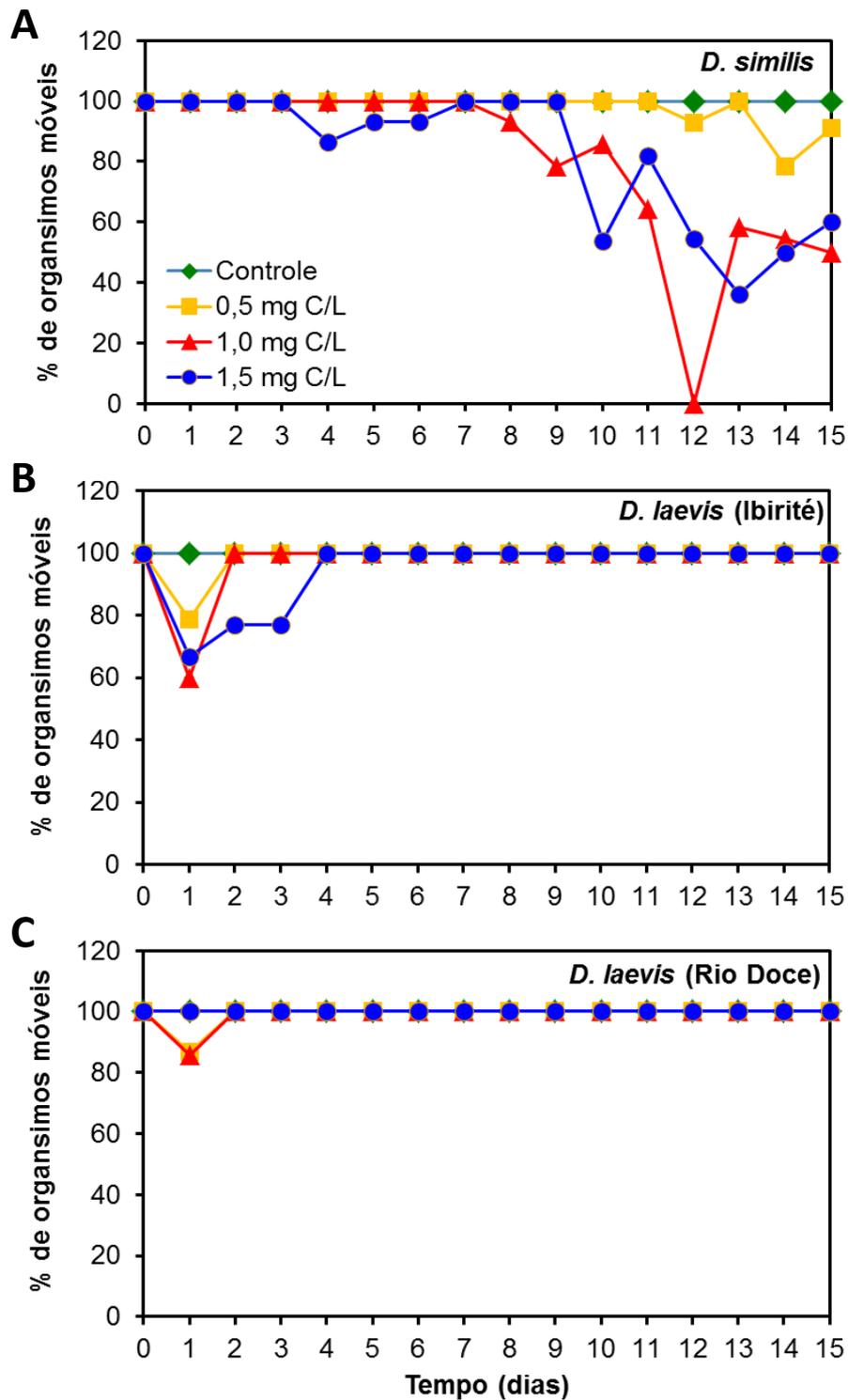


Figura 7. Mobilidade (em %) de A) *D. similis*; B) *D. laevis* (Ibirité); C) *D. laevis* (Rio Doce) em função do tempo (dias) expostas à concentração fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e variável de CYLCAM-1 em ensaio crônico.

Em relação à reprodução, foram observados efeitos nos parâmetros de idade da 1ª reprodução, fecundidade média, total de neonatos e taxa intrínseca de crescimento populacional (r) de todas as espécies (Fig. 8). No parâmetro idade da primeira reprodução, que indica o primeiro dia que a fêmea produz ovos, apenas as espécies *D. similis* e *D. laevis* (Rio Doce) apresentaram atraso na reprodução ($p = 0,002$ e $p = 0,009$) e, somente na maior concentração de $1,5 \text{ mg C L}^{-1}$ (Fig. 8A). No parâmetro fecundidade média, que analisa o número médio de neonatos produzidos por fêmeas ao longo do seu ciclo reprodutivo, *D. similis* apresentou redução significativa em todas as concentrações ($p < 0,001$). *D. laevis* (Rio Doce) também sofreu efeito negativo ($p < 0,001$) (Fig. 8B). O total de neonatos produzidos por *D. similis*, *D. laevis* (Rio Doce) e *D. gessneri* apresentou uma redução significativa em todas as concentrações ($p < 0,001$). O clone *D. laevis* (Ibirité) não foi afetado nos parâmetros de fecundidade média e no total de neonatos produzidos em nenhum dos tratamentos (Fig. 8B e 8C). A taxa intrínseca de aumento populacional (r) demonstrou uma redução para *D. similis* e *D. laevis* (Rio Doce) em todas as concentrações ($p < 0,001$), com *D. similis* apresentando inclusive um efeito dose-resposta, com redução do valor de r à medida que aumentou a concentração de CYLCAM-1 nos tratamentos. *D. laevis* (Ibirité) e *D. gessneri* sofreram uma menor variação entre os tratamentos ($p = 0,001$ e $p = 0,009$) (Fig. 7D).

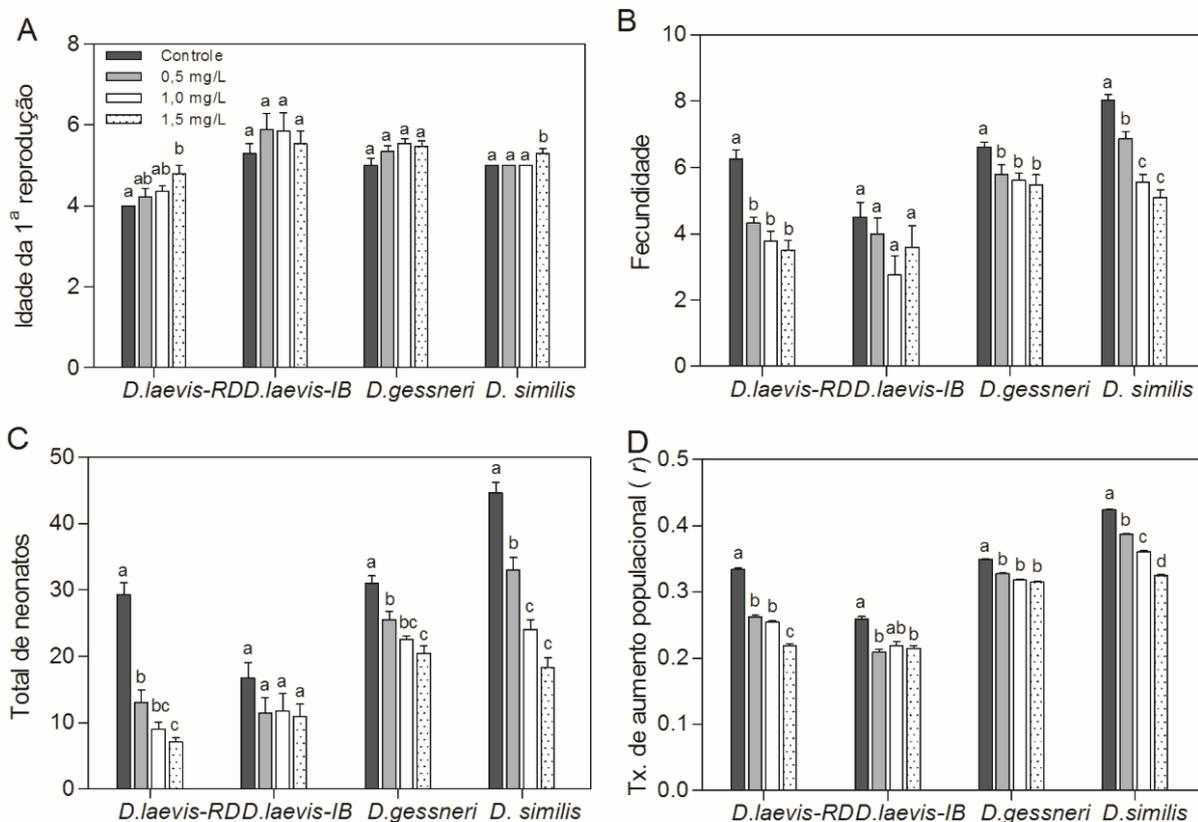


Figura 8. Parâmetros populacionais de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Ibirité), *D. gessneri* e *D. similis*. A) Idade da primeira reprodução; B) Fecundidade média; C) Total de neonatos; D) Taxa intrínseca de aumento populacional (r). Os tratamentos possuem uma concentração fixa de clorófitas ($0,4 \text{ mg C L}^{-1}$) e proporção variável de cianobactéria. O controle refere-se a uma concentração com apenas clorófitas (*S. capricornutum* + *A. falcatus*). Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$).

No ensaio ecotoxicológico crônico com tratamentos de proporções variadas de clorófitas e cianobactéria, foram observados efeitos significativos na taxa de crescimento somático no tratamento de 90% de carbono na dieta ($0,9 \text{ mg C L}^{-1}$) para *D. laevis* (Rio Doce) e 50% e 90% ($0,5$ e $0,9 \text{ mg C L}^{-1}$) para *D. laevis* (Ibirité) ($p > 0,0001$) (Fig. 9). Não foi possível calcular a taxa de crescimento para *D. gessneri*, devido à morte de todos os organismos nos tratamentos com $0,5$ e $0,9 \text{ mg C L}^{-1}$.

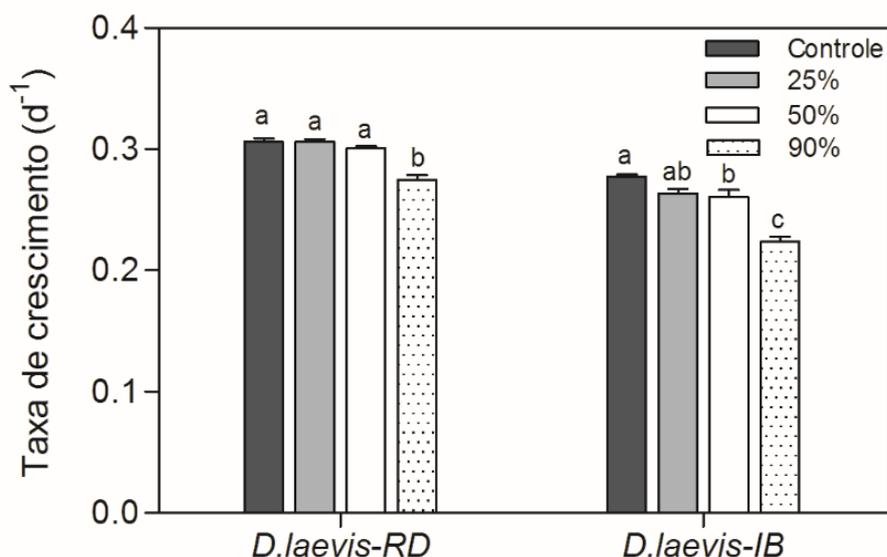


Figura 9. Taxa de crescimento somático de *D. laevis* (Rio Doce) e *D. laevis* (Ibirité) expostas a tratamentos com diferentes proporções de clorófitas (100-10%) e cianobactéria (0-90%) no ensaio crônico. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey $p < 0,05$).

Assim como no ensaio crônico anterior, os clones de *D. laevis* não apresentaram redução na sobrevivência. No entanto, *D. gessneri* sofreu redução na sobrevivência no decorrer dos 15 dias, com declínio do número de indivíduos dependente da concentração e mortalidade de todos os indivíduos na concentração de 0,9 mg C L⁻¹ no 11º dia e na concentração de 0,5 mg C L⁻¹ no 14º dia. Na concentração de 0,25 mg C L⁻¹, também ocorreu redução da sobrevivência, porém menor, chegando a 64% de mortalidade no último dia. (Fig. 10). A alta mortalidade de *D. gessneri* permitiu que fossem calculadas a CL₅₀ de 0,25 (0,17 – 0,34) mg C L⁻¹ e CE₅₀ de 0,56 (0,53 – 0,61) mg C L⁻¹ (Fig. 11). Os valores de CE₅₀ podem ser observados na Tabela 3. Embora esse ensaio tenha apresentado concentração de STX variando de 5,0 a 15,2 ng L⁻¹, não foi observado efeito na mobilidade de nenhum dos clones de *Daphnia*.

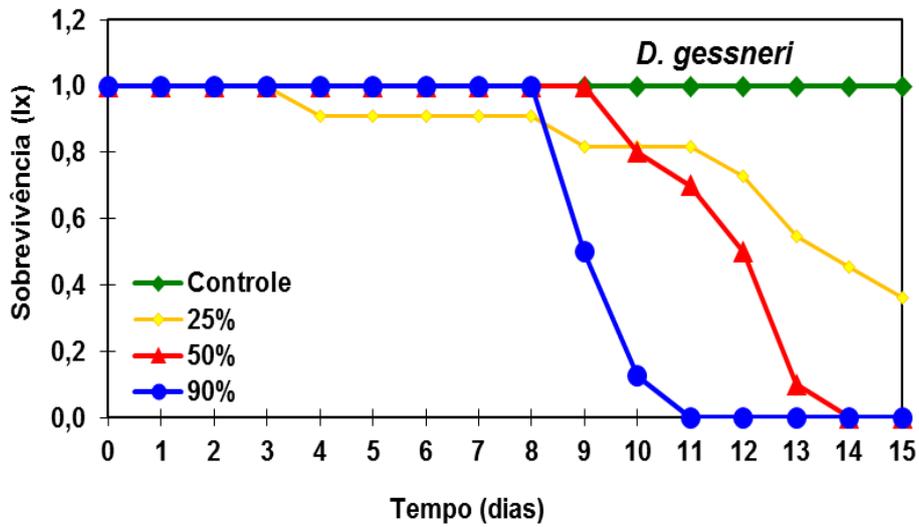


Figura 10. Sobrevivência (lx) de *D. gessneri* em função do tempo (dias) expostas a tratamentos com diferentes proporções de clorófitas (100-10%) e cianobactéria (0-90%) no ensaio crônico.

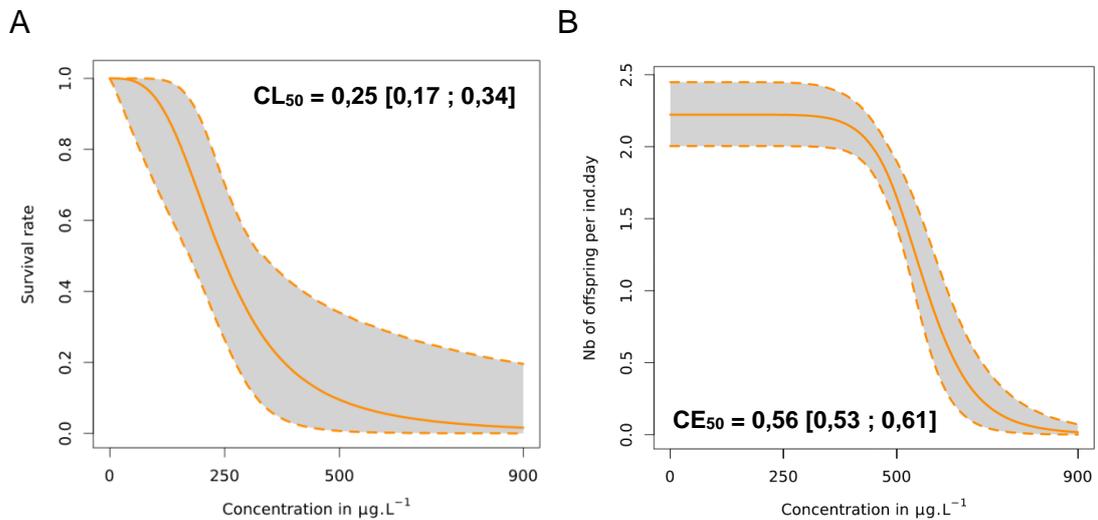


Figura 11. Estimativas da CL_{50} e da CE_{50} para *D. gessneri* no ensaio crônico com tratamentos variando proporções de clorófitas (100-10%) e cianobactéria (0-90%). A) Curva de sobrevivência em função da concentração de carbono ($\mu\text{g L}^{-1}$); B) Curva de número de neonatos produzidos por fêmea por dia em função da concentração de carbono ($\mu\text{g L}^{-1}$). Os valores entre colchetes indicam os intervalos de 95% de confiança. Os valores de CL_{50}/CE_{50} e as curvas foram gerados pela plataforma MOSAIC (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/mosaic/>).

Tabela 3. Estimativas da CL₅₀ e CE₅₀ de *D. laevis* (Ibirité), *D. laevis* (Rio Doce) e *D. gessneri* expostas a tratamentos com diferentes proporções de clorófitas (100-10%) e cianobactéria (0-90%) no ensaio crônico. Os símbolos (-) indicam que não foi possível calcular as estimativas para a espécie.

Espécie	CL50 (mg C L ⁻¹)	CE50 (mg C L ⁻¹)
<i>D. laevis</i> (Ibirité)	-	0,81 (0,23 - 0,95)
<i>D. laevis</i> (Rio Doce)	-	0,89 (0,76 - 0,97)
<i>D. gessneri</i>	0,25 (0,17 - 0,34)	0,56 (0,53 - 0,61)

De um modo geral, os parâmetros populacionais, assim como na taxa de crescimento somático, apresentaram efeitos negativos apenas no tratamento de 90% CYLCAM-1 para todas as espécies, com *D. gessneri* apresentando maior variação entre os tratamentos, principalmente no parâmetro total de neonatos e na taxa intrínseca de aumento populacional (r) (Fig. 12). No parâmetro idade da 1ª reprodução, todas as espécies sofreram atraso na reprodução em 0,9 mg C L⁻¹: *D. laevis* (Rio Doce; $p=0,004$; *D. laevis* (Ibirité) $p<0,001$ e *D. gessneri* $p=0,001$ (Fig. 12A). A fecundidade média apresentou redução do número de ninhadas por fêmea: *D. laevis* (Rio Doce) $p<0,001$; *D. laevis* (Ibirité) $p=0,004$ e *D. gessneri* $p<0,001$ (Fig. 12B). O total de neonatos do mesmo modo foi reduzido significativamente somente em 0,9 mg C L⁻¹ de cianobactéria para *D. laevis* (Rio Doce; $p<0,001$) e *D. laevis* (Ibirité) $p=0,006$, sendo que para *D. gessneri* $p<0,001$ houve uma redução mais drástica no total de neonatos, sendo significativa também em 0,25 e 0,5 mg C L⁻¹ (Fig. 12C). A taxa intrínseca de aumento populacional (r) foi negativa para *D. gessneri* em 90% de cianobactéria ($p<0,05$), devido ao número reduzido de neonatos produzidos por fêmea (somente uma fêmea reproduziu em 0,9 mg C L⁻¹). Os clones *D. laevis* (Rio Doce) e *D. laevis* (Ibirité) sofreram reduções significativas apenas em 0,9 mg C L⁻¹ (Fig. 12D).

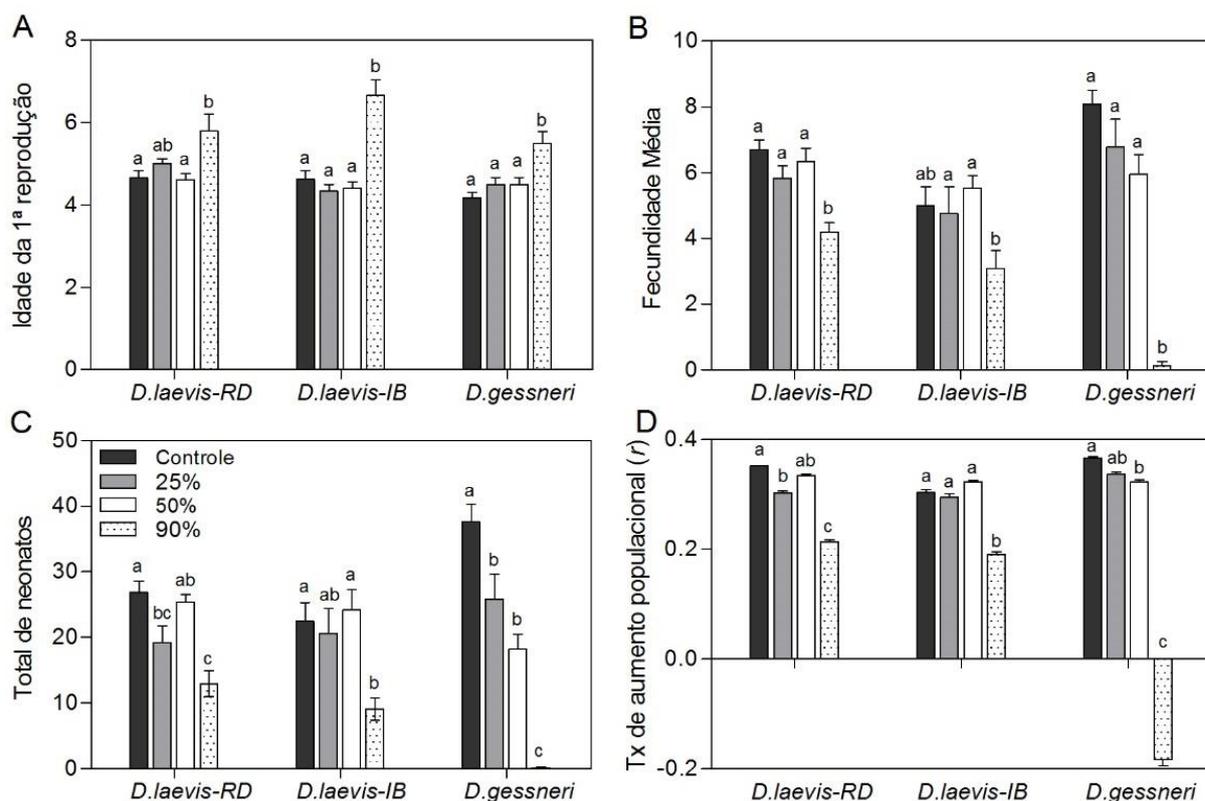


Figura 12. Parâmetros populacionais de *D. laevis* (Rio Doce), *D. laevis* (Ibirité) e *D. gessneri*. A) Idade da primeira reprodução; B) Fecundidade média; C) Total de neonatos; D) Taxa intrínseca de aumento populacional (r). Os tratamentos possuem proporções variáveis de clorófitas (100-10%) e de cianobactéria (0-90%) a uma concentração total de 1,0 mg C L⁻¹. O controle refere-se a uma concentração com apenas clorófitas (*S. capricornutum* + *A. falcatus*). Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$).

No ensaio de herbivoria com clones de *D. laevis*, CYLCAM-1 apresentou concentração de STX variando de 7,2 a 25,9 ng L⁻¹ (Tabela 2). Ocorreu redução significativa na taxa de filtração total (TF) e de clorófitas no tratamento de 0,9 mg C L⁻¹ apenas para *D. laevis* (Ibirité) ($p < 0,001$) (Fig. 13). No entanto, quando foi analisado separadamente a taxa de filtração somente de clorófitas (*S. capricornutum*), ocorreu uma redução significativa com TF negativa para *D. laevis* (Rio Doce) no tratamento de 0,9 mg C L⁻¹ ($p = 0,002$) (Fig. 13). Não foi detectado sinal inicial e final na faixa azul (cianobactéria) no tratamento de 25%, por isso não foi possível quantificar a taxa de filtração de cianobactéria nesta concentração.

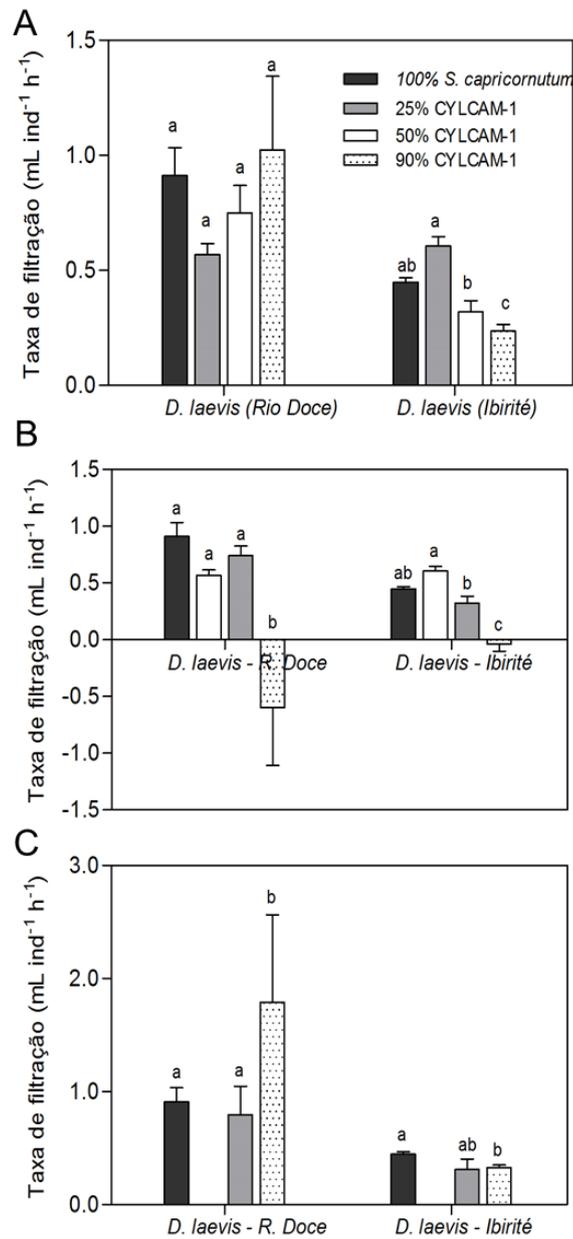


Figura 13. A. Taxa de filtração total; B. Taxa de filtração de *S. capricornutum* e C. Taxa de filtração de CYLCAM-1 de *D. laevis* (Rio Doce) e *D. laevis* (Ibirité) expostas a tratamentos com proporções variáveis de clorofíceas (100-10%) e cianobactéria (0-90%) a uma concentração total de 1,0 mg C L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey p < 0,05).

No ensaio de herbivoria com *D. similis* e *D. gessneri* a concentração de STX variou de 3,3 a 11,9 ng L⁻¹. Não ocorreu efeito significativo na taxa de filtração total para nenhuma das espécies (Fig. 14A). No entanto, houve aumento da taxa de filtração de *D. gessneri* quando analisada apenas *S. capricornutum* (p=0,0003) no

tratamento de 90% (Fig. 14B) e redução da taxa de filtração quando analisada apenas CYLCAM-1 ($p < 0,001$) no tratamento de 50% (Fig. 14C). Apesar de ocorrer uma tendência a um aumento na taxa de filtração de *S. capricornutum* e redução da taxa de filtração de CYLCAM-1 em *D. similis*, não houve efeito significativo em nenhum dos tratamentos. Da mesma forma que no ensaio de herbivoria anterior, não houve sinal inicial e final da faixa azul na concentração de 25% e, portanto, não foi possível estimar a taxa de filtração de cianobactéria nesta concentração para as espécies.

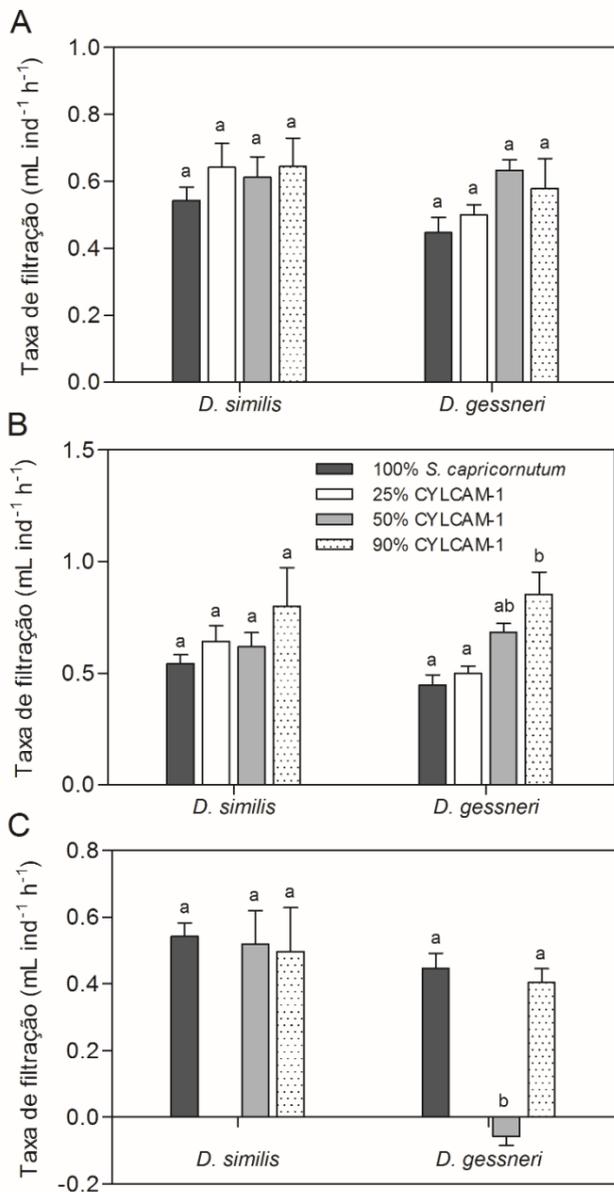


Figura 14. A. Taxa de filtração total; B. Taxa de filtração de *S. capricornutum* e C. Taxa de filtração de CYLCAM-1 de *D. similis* e *D. gessneri* expostas à tratamentos com proporções variáveis de clorófitas (100-10%) e cianobactéria (0-90%) a uma concentração total de 1,0 mg C L⁻¹. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA, Teste de Tukey p <0,05).

Tabela 4. Concentrações de saxitoxina (STX) nos ensaios agudo, crônico com concentração de clorófitas fixa (1), crônico com concentração de clorófitas e cianobactéria variáveis (2), ensaio de herbivoria com clones de *D. laevis* (1) e ensaio de herbivoria com *D. similis* e *D. gessneri* (2).

Experimento	Data	Concentração (mg C L ⁻¹)	STX (ng/L)
Agudo	24/10/2016	0,13	0,6
		0,25	1,3
		0,50	2,6
		1,00	5,1
Crônico 1	16/05/2017	0,50	1,5
		1,00	3,0
		1,50	4,5
Crônico 2	12/03/2018	0,25	5,0
		0,50	9,9
		0,90	15,2
Herbivoria 1	16/02/2018	0,25	7,2
		0,50	14,4
		0,90	25,9
Herbivoria 2	03/05/2018	0,25	3,3
		0,50	6,6
		0,90	11,9

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos mostraram que existem diversas respostas e diferentes níveis de sensibilidade de *Daphnia* à cepa de *C. raciborskii* (CYLCAM-1). Os efeitos agudos e crônicos observados na sobrevivência, mobilidade, reprodução e taxa de filtração desses organismos, podem ter ocorrido tanto devido à presença de toxinas (Ferrão-Filho *et al.*, 2009), quanto às características morfológicas e baixo valor nutritivo de cianobactérias (Soares *et al.*, 2009) e também devido as diferentes estratégias dos cladóceros.

No ensaio agudo com proporção fixa de clorófitas e variável de cianobactéria foi observado efeito na taxa de crescimento somático e redução da sobrevivência de *D. similis*. Utilizando cepa CYLCAM-2 em ensaio agudo *D. similis* e um clone de *D. laevis* (Ibirité) a tratamentos com proporções fixas e variáveis de cianobactéria e de clorófitas ocorreu redução da sobrevivência e na taxa de crescimento somático dessas duas espécies, porém sem efeito na mobilidade desses organismos (Dias, 2014). Em ensaio agudo utilizando tratamentos com cepa de *Microcystis* (MIRF-1) e *C. raciborskii* (CYRF-1) isoladamente, *D. laevis* (Ibirité) mostrou baixa mortalidade e não apresentou paralisia dos movimentos de natação, enquanto que *D. similis* e *Moina micrura* mostraram-se mais afetadas nesses tratamentos (Ferrão-Filho *et al.*, 2017).

No ensaio ecotoxicológico crônico com proporção fixa de clorófitas, portanto sem restrição alimentar, ficou evidenciada a toxicidade da cepa CYLCAM-1 e seus efeitos deletérios no ciclo de vida de *Daphnia* isolada de ambientes aquáticos brasileiros e de ambiente temperado, porém com diferenças de sensibilidade entre as espécies. Esses resultados podem ser corroborados por estudos utilizando outras cepas de *C. raciborskii* (Ferrão-Filho *et al.*, 2008; Ferrão-Filho *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013).

D. similis teve sua sobrevivência, mobilidade e reprodução afetados negativamente, sendo uma das espécies mais sensíveis. Efeitos sinérgicos da mistura de MIRF-1 (*Microcystis aeruginosa*) e CYRF-1 (*Cylindrospermopsis raciborskii*), produtoras de microcistinas e saxitoxinas, respectivamente, já foram relatados para essa espécie (Ferrão-Filho *et al.*, 2017), sendo que a cepa CYRF-1 causou mais efeitos negativos na sua sobrevivência, reprodução, atividade

antioxidante e taxa de filtração do que a cepa MIRF-1. Outros estudos utilizando cladóceros exóticos e de grande porte também apresentaram resultados similares. Efeitos adversos de uma cepa de *Aphanizomenon issatschenkoi* produtora de STXs, foram observados na sobrevivência e no desenvolvimento de *D. magna* e também que essa espécie pode acumular STXs (Nogueira *et al.*, 2004).

Apesar de não sofrer redução da sobrevivência nem na mobilidade nos dois ensaios crônicos, os clones de *D. laevis* sofreram reduções significativas na taxa de crescimento somático, nos parâmetros reprodutivos e na taxa de aumento populacional (r). Provavelmente, o custo energético investido na sobrevivência, pode ter diminuído a aptidão desses animais, causando redução da fecundidade e do crescimento. Existe um limite na tolerância a cianobactérias por *Daphnia*, sendo que concentrações acima desse limite causam efeitos diretamente na sobrevivência e abaixo deste limite afetam a fecundidade e taxa de crescimento (Sarnelle *et al.*, 2010).

Os efeitos crônicos nos parâmetros reprodutivos e no crescimento somático de *D. laevis* (Rio Doce), foram mais acentuados no ensaio com concentração fixa de clorófitas, onde todos os tratamentos possuíam 0,4 mg C L⁻¹ de *S. capricornutum* e *A. falcatus*, que é a mesma concentração utilizada na manutenção dos organismos em laboratório. Portanto, apenas o baixo valor nutricional das cianobactérias não explica a redução na fecundidade e no crescimento somático, visto que esses organismos receberam quantidade suficiente de alimento com boa qualidade nutricional, evidenciando provavelmente um efeito tóxico devido à presença de STX. Neste ensaio, *D. laevis* (Rio Doce) foi mais sensível em todos os parâmetros populacionais em relação a *D. laevis* (Ibirité). Por outro lado, no ensaio com proporções variadas de clorófitas e cianobactéria os dois clones não demonstraram muita variação nesses parâmetros. Esses resultados podem indicar que *D. laevis* (Rio Doce) seja mais afetada pelo efeito tóxico da cepa CYLCAM-1, enquanto que *D. laevis* (Ibirité) seja mais afetada pela deficiência de alimento nutritivo, pois sofreu maiores efeitos sobre sua reprodução quando exposta a tratamentos com proporção reduzida de clorófitas. *D. laevis* pode coexistir por longos períodos com extensivas florações de *Microcystis sp.*, mas suas reservas de lipídeos totais diminuem (Pinto-Coelho *et al.*, 2003). Algas e cianobactérias com

formas filamentosas, além de aumentarem o gasto energético dos cladóceros pela movimentação excessiva para a rejeição de partículas do pós-abdômen, podem também obstruir a câmara de filtração desses animais (Porter e Orcutt, 1980). Assim, os efeitos negativos observados nos cladóceros poderiam ser também explicados por um efeito mecânico produzido pelos filamentos da cianobactéria, obstruindo sua câmara filtradora.

Os resultados do ensaio crônico com proporções variáveis de clorófitas e cianobactéria para os clones de *D. laevis* corroboram resultados relatados em outro estudo, onde um clone de *D. laevis* isolado da Lagoa da Pampulha-MG apresentou redução da fecundidade quando exposto cronicamente à cepa CYRF-1 (produtora de STXs) e à cepa NPCS-1 (não produtora de STXs), ambas de *C. raciborskii*. Provavelmente, existe algum metabólito não identificado na cepa não produtora que pode exercer efeito em *D. laevis*. No entanto, os efeitos da cepa CYRF-1 foram mais acentuados que os da cepa NPCS-1. O efeito de interferência mecânica dos filamentos também não pode ser descartado (Restani, 2011).

Entre as espécies nativas, *D. gessneri* foi a que apresentou respostas mais contrastantes entre os dois ensaios crônicos realizados. Enquanto no ensaio crônico com concentração fixa de clorófitas (sem restrição alimentar) a espécie foi mais tolerante, apresentando poucos efeitos negativos, no ensaio crônico com proporções variáveis de clorófitas e cianobactéria (com restrição alimentar) sofreu maiores efeitos deletérios na reprodução, principalmente no total de neonatos e taxa de aumento populacional (r). Em relação à sobrevivência, nos dois ensaios crônicos, os resultados não mostraram resistência de *D. gessneri* como em estudos anteriores onde essa espécie apresentou alta sobrevivência até o fim do experimento (Silva, 2012; Costa *et al.*, 2013). Em ambos os ensaios do presente estudo, *D. gessneri* apresentou redução da sobrevivência ao longo dos dias. Apesar desta espécie apresentar número considerável de indivíduos que chegaram à idade de maturidade reprodutiva, todos os organismos morreram nas concentrações de 50% e 90% CYLCAM-1 no ensaio crônico com proporções variáveis de clorófitas e cianobactéria, apresentando taxa de aumento populacional (r) negativa.

Estes efeitos poderiam ser explicados pela qualidade nutricional do alimento fornecido à *Daphnia*, uma vez que a fecundidade das fêmeas está relacionada à

quantidade e à qualidade do alimento. Assim como *D. laevis* (Ibirité), é possível que *D. gessneri* seja mais sensível à falta de alimento nutritivo, dessa maneira, provavelmente os efeitos observados no ensaio com proporções variáveis de clorófitas e cianobactéria seja devido à deficiência nutricional do tratamento com maior proporção de CYLCAM-1. No primeiro ensaio, havia uma quantidade suficiente de alimento nutritivo (clorófitas), o que forneceu taxas de crescimento altas, mesmo nas maiores concentrações de CYLCAM-1. Já no segundo ensaio crônico, na maior proporção de CYLCAM-1 houve taxas de crescimento menores. Utilizando misturas de cianobactéria e clorófitas (*S. obliquus*), foram relatados efeitos da cepa CYRF-1 em *D. magna*, como reduções na sobrevivência, crescimento corporal, taxa de crescimento populacional (r) e taxa de filtração. No entanto, esses efeitos só foram notados nas proporções mais altas de CYRF-1 (75% e 100%) (Soares *et al.*, 2009). De fato, cianobactérias são geralmente, deficientes em alguns ácidos graxos polinsaturados e esteróis, que são considerados limitantes ao crescimento do zooplâncton (Müller-Navarra *et al.*, 2000; Wacker e Vonekert, 2001). A cepa CYLCAM-1 demonstrou-se menos tóxica do que cepas testadas anteriormente, pois provocou efeitos negativos somente em concentrações muito maiores. Portanto, além da toxicidade, os efeitos negativos na sobrevivência e fecundidade das espécies podem ser devido a um conjunto de fatores, tais como suas características bioquímicas e capacidade de interferir mecanicamente no processo de filtração de partículas e menor digestibilidade (Repka *et al.*, 1999; Schwarzenberger *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo corroboram os de outro onde *D. gessneri* apresentou atraso na idade da primeira reprodução e na liberação de neonatos, com queda da sua taxa de aumento populacional (r) quando exposta a diluições com maior concentração de cianobactéria preparadas a partir de água reservatório eutrofizado, com dominância de *C. raciborskii* e *Planktothrix agardhii* (Silva, 2012). No entanto, em outro trabalho *D. gessneri* apresentou taxa de aumento populacional (r) constante ou até maior que no controle quando foi exposta a água de reservatório eutrofizado com dominância de *Dolichospermum*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* (Ferrão-Filho *et al.*, 2009). Em tratamento com 100% CYRF-1, *D. magna* sobreviveu por nove dias, enquanto que em tratamento sem alimento sobreviveram por apenas sete dias, concluindo que a cepa CYRF-1 não apresentou toxicidade a *D. magna*,

mas foi um alimento de baixa qualidade nutricional (Soares *et al.*, 2009). Utilizando a cepa T3, produtora de STXs, verificou-se que a mesma não interferiu na sobrevivência dos cladóceros *D. pulex* e *M. micrura*, embora tenham apresentado prejuízos no crescimento e fecundidade, enquanto *D. gessneri* demonstrou resistência a esta mesma cepa, não apresentando paralisia e nem tendo seu desenvolvimento afetado (Costa, 2005).

É importante destacar que o clone de *D. gessneri* desse estudo possui origem diferente do utilizado em estudos anteriores, o que poderia explicar as diferentes tolerâncias da mesma espécie de *Daphnia* a *C. raciborskii*. As diferenças entre clones de *Daphnia* podem ser dependentes do genótipo e da história de vida destes organismos (Bednarska *et al.*, 2014). O clone da espécie *D. gessneri* foi isolado do Reservatório do Apertado, localizado em Mucugê (BA), onde não há relatos de ocorrência de florações de cianobactérias. O clone *D. laevis* (Ibirité) foi isolado da Lagoa do Ibirité (MG), onde o fitoplâncton é dominado por *Microcystis* spp. (Garcia *et al.*, 2009). Já o clone *D. laevis* (Rio Doce) foi isolado do Lago Jacaré (Parque Estadual do Rio Doce, MG) onde já foi relatada a ocorrência de *C. raciborskii* (Miranda *et al.*, 2013). Portanto, talvez a maior tolerância de *D. laevis* se explique pela maior exposição prévia destes clones a cianobactérias.

Em todos os ensaios (agudo e crônicos) houve redução na taxa de crescimento somático de todas as espécies expostas a concentrações de CYLCAM-1 em relação ao controle. Durante os ensaios foi observado que todas as espécies apresentavam filamentos presos aos seus apêndices filtradores nos tratamentos com CYLCAM-1. Provavelmente, devido à dificuldade em filtrar filamentos de *C. raciborskii*, esses animais podem sofrer obstrução da câmara filtradora prejudicando seu crescimento corporal por terem que investir maior energia na expulsão de filamentos através do movimento do seu pós-abdomen. Uma redução nos batimentos dos apêndices torácicos e um aumento de rejeição de partículas pelo pós-abdome de *D. carinata* quando exposta a um filtrado de *A. flos-aquae* e STX purificada já foi relatado (Haney *et al.*, 1995). Em estudo com cepas produtoras (*C. raciborskii* e *Aphanizomenon ovalisporum*) e não-produtoras (*C. raciborskii*) de cilindrospermopsina, foram encontrados efeitos na sobrevivência e no crescimento somático de *D. magna*, além de danos ao epitélio digestivo quando submetidos à

cepa de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina (Nogueira *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2006).

As STXs agem nas células nervosas, inibindo a transmissão do impulso nervoso, causando a imobilidade de cladóceros (Ferrão-Filho *et al.*, 2007). O ensaio crônico com concentração fixa de clorofíceas foi caracterizado pela paralisia dos movimentos natatórios dos clones de *D. laevis* e *D. similis* expostas à cepa CYLCAM-1, produtora de STXs. Os organismos se mantiveram imóveis no fundo dos tubos de ensaio, sendo incapazes de se locomover na coluna d'água. É importante destacar que *D. similis* apresentou imobilidade ao final do ensaio acompanhada de grande mortalidade, enquanto que os clones de *D. laevis* sofreram imobilidade no início do ensaio, se recuperaram nos dias seguintes e não apresentaram mortalidade. O movimento dos apêndices torácicos não é alterado, permitindo aos animais sobreviver por algum período inativos, graças à manutenção da taxa de filtração de partículas alimentares (Costa, 2005). A imobilidade de *D. similis* e clones de *D. laevis* nos tratamentos com *C. raciborskii* está de acordo com estudos realizados com outros cladóceros tropicais e exóticos. Estudos utilizando o séston do reservatório do Funil-RJ e duas cepas de *C. raciborskii* produtoras de saxitoxina (T3 e CYRF-1), mostraram efeito de paralisia em *D. pulex* e *M. micrura* (Ferrão-Filho *et al.*, 2008). No presente trabalho, os clones de *D. laevis* apresentaram imobilidade nas concentrações mais altas, paralisando num curto período de tempo e levando mais tempo para se recuperar. Em outro estudo, a cepa CYRF-1, produtora de STXs (STX e neoSTX) do mesmo modo, causou a imobilidade de *D. laevis* (Restani e Fonseca, 2014). A ausência de imobilidade de *D. gessneri* nos dois ensaios crônicos também foi observada quando exposta a outras cepas de *C. raciborskii* (Silva, 2012; Costa *et al.*, 2013; Ferrão-Filho *et al.*, 2014).

O ensaio de herbivoria mostrou que *D. laevis* (Rio Doce) não tem sua taxa de filtração alterada por CYLCAM-1, por outro lado *D. laevis* (Ibirité) diminui sua taxa de filtração quando expostas a tratamentos com a cepa. Provavelmente, o segundo clone reduziu sua taxa de filtração devido à presença de toxinas, baixa qualidade nutricional e/ou morfologia de *C. raciborskii*. Por outro lado, *D. magna* mesmo apresentando inibição alimentar, continua com taxa de aumento populacional (r) positiva, indicando que esses organismos conseguem se manter em ambientes eutróficos dominado por cianobactérias (Soares *et al.*, 2009). Portanto, é possível

que apesar da redução da taxa de filtração *D. laevis* (Ibirité), se mantenha apta, visto que nos ensaios crônicos esse clone foi menos afetado nos parâmetros reprodutivos e na taxa de aumento populacional (r). Enquanto algumas espécies de *Daphnia* mostram taxa de filtração baixa durante 24 horas quando expostas a cianobactérias tóxicas, mostrando alta resistência, outras apresentam filtração crescente durante o mesmo período, ou seja, a fome durante a exposição prolongada às cianobactérias é um fator que exerce influência na resistência (DeMott, 1989).

Em uma análise da dieta de *D. laevis*, encontraram que cianobactérias estiveram praticamente ausentes em seu trato digestivo, sendo detectadas apenas pequenas quantidades de colônias de *Microcystis aeruginosa* não digeridas em seus intestinos (Eskinazi-Sant'Anna *et al.*, 2002). Embora não tenham sido realizados ensaios de seletividade nesse estudo, *D. laevis* em condições de laboratório pode ser seletiva na sua fonte alimentar, e no ambiente isso também pode ser possível quando as condições forem similares (Restani, 2011). Por outro lado, *D. laevis* (Rio Doce) parece ingerir os filamentos de *C. raciborskii*, ficando mais exposta aos efeitos negativos, como dificuldade de manuseio e toxicidade da cianobactéria. Apesar dos clones de *D. laevis* serem de médio porte (1,8 mm), já foi observada a ingestão de filamentos grandes em outros estudos em cladóceros de tamanho semelhante. *D. pulex* (0,6 a 1,1 mm) quando exposta a cepas produtoras de STXs, foi significativamente mais afetada na sua taxa de filtração ingerindo filamentos longos de MVCC19 ($863,5 \pm 483,3$) e CYRF-01 ($338,7 \pm 190,3$) do que o copépodo *Notodiaptomus iheringi* (Fabre *et al.*, 2017). O presente ensaio apresentou filamentos com comprimento médio de $426,7 \pm 208,4$ μm que poderiam prejudicar o desenvolvimento dos animais. Copépodos parecem lidar melhor com a presença de cianobactérias filamentosas (Ger *et al.*, 2011). Eles são capazes de cortar longos filamentos (Bouvy *et al.*, 2001) e podem evitar cepas tóxicas (Panosso *et al.*, 2003). Cladóceros por outro lado são generalistas e cianobactérias filamentosas podem obstruir seu aparelho filtrador. No entanto, estudos sugerem que a toxicidade parece interferir mais que a morfologia na herbivoria do zooplâncton. O copépodo *Eudiaptomus gracilis* apresentou redução de sua taxa de filtração quando exposto a tratamentos com cepa tóxica de *C. raciborskii* (CYRF-1), independentemente do comprimento dos filamentos, enquanto que em tratamentos com cepa não-tóxica (CS1) e de filamentos longos (158 μm) a taxa de filtração não sofreu grande

variação (Rangel *et al.*, 2016). Em experimentos com *D. magna* (2 mm) não foram encontradas diferenças entre as taxas de filtração quando os animais foram alimentados com filamentos curtos e longos (61 e 137 μ) de *C. raciborskii* (CYRF-01). Portanto, filamentos mais longos podem não necessariamente causar inibição alimentar mais forte do que os mais curtos e a toxicidade é um fator que deve ser considerado (Panosso e Lüring, 2010).

Quando analisada apenas a taxa de filtração de clorófitas (*S. capricornutum*) de *D. laevis* (Rio Doce), ocorreu uma diminuição da filtração que chegou a ser negativa, o que poderia sugerir inibição da filtração de alimento nutritivo. Em outro estudo, as espécies *D. laevis*, *D. similis* e *M. micrura* apresentaram inibição na taxa de filtração de *S. capricornutum* em tratamento com CYRF-1, e *M. micrura* em tratamento com mistura de CYRF-1 e MIRF-1 (Ferrão-Filho *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo a redução ocorreu apenas no tratamento com maior proporção de cianobactéria (90%) e baixa proporção de clorófitas (10%), o que poderia levar *D. laevis* (Rio Doce) a filtrar o alimento que estava em maior concentração em relação ao outro.

No ensaio de herbivoria, *D. gessneri* e *D. similis* demonstraram uma tendência ao aumento da taxa de filtração de clorófitas nos tratamentos com cianobactéria, com *D. gessneri* apresentando inclusive taxa de filtração negativa de CYLCAM-1 no tratamento com 50% de cianobactéria. Essa redução poderia ser explicada devido à seletividade de *D. gessneri*, que poderia estar evitando o alimento com baixo valor nutricional (cianobactéria). Alguns estudos já demonstraram seletividade positiva em cladóceros. Apesar de cladóceros em geral serem considerados filtradores não-seletivos, experimentos com *D. ambigua* revelaram que estas podem evitar cepas tóxicas de *M. aeruginosa* (Tillmanns *et al.*, 2011). Utilizando gravação de vídeo, *D. pulicaria* foi capaz de discernir entre cepa de *Microcystis* tóxica e a clorófitas *Scenedesmus*, diminuindo seu movimento mandibular na presença desta cianobactéria (Ghadouani *et al.*, 2004). Taxas de filtração maiores da clorófitas *S. capricornutum* foram observadas em tratamentos com mistura de MIRF-1 e CYRF-1 do que em todos os outros tratamentos para *D. laevis* e *D. similis*, sugerindo não haver inibição alimentar desses cladóceros e talvez filtração seletiva (Ferrão-Filho *et al.*, 2017). Por outro lado, a taxa de filtração do copépodo *Boeckella* sp. em uma dieta de *C. raciborskii* foi menor do que a de *Ceriodaphnia* sp. quando ambos os

animais tinham escolha entre *C. raciborskii* e a clorofíceia *Chlamydomonas reinhardtii*, indicando preferência alimentar do copépodo (Hong *et al.*, 2013).

O comportamento alimentar de *D. similis* provavelmente explica sua sensibilidade nesse e em estudos anteriores. Esse ensaio apresentou filamentos com comprimento médio de $328,2 \pm 186 \mu\text{m}$. Da mesma maneira que no ensaio de herbivoria com clones de *D. laevis*, a presença de filamentos longos poderia interferir na alimentação de *D. similis* e *D. gessneri*. Por possuir tamanho corporal grande (~2 mm), *D. similis* conseguiria ingerir cianobactérias com maior facilidade e como consequência sofrer redução do seu “fitness” com efeitos negativos na sua sobrevivência e fecundidade (Ferrão-Filho *et al.*, 2009). Curiosamente, essa espécie foi uma das mais afetadas nos ensaios desse trabalho. Outra explicação seria que ambientes eutrofizados geralmente apresentam dominância de rotíferos e copépodos, enquanto cladóceros quando presentes, são pequenos (Gomes *et al.*, 2009). Existe uma forte seletividade do zooplâncton conforme o tamanho corporal (Wilson *et al.*, 2006). O zooplâncton com tamanho corporal maior estaria mais susceptível a ser afetado negativamente que o de tamanho menor (Leonard e Pearl, 2005; Hart e Bychek, 2011). Dessa maneira, *D. similis*, que é grande (2 mm), seria mais afetada por *C. raciborskii* que outras espécies de cladóceros de porte menor.

Para melhor compreensão dos resultados desse trabalho é importante conhecer a história de vida das espécies testadas. Não podemos excluir a possibilidade de *C. raciborskii* ter efeitos diferentes sobre a herbivoria de espécies de *Daphnia* e outros gêneros do zooplâncton, devido à natureza específica de respostas desses organismos a cianobactérias (Tillmanns *et al.*, 2008). A espécie exótica *D. similis* é cultivada em laboratório no Brasil há mais de 30 anos, portanto não tem contato com cianobactérias por muito mais tempo que as outras espécies nativas. Enquanto os clones de *D. laevis* foram isolados de corpos aquáticos brasileiros eutrofizados e com registro de florações. Cianobactérias dominando ambientes durante longos períodos podem atuar como força de seleção natural sobre populações de *Daphnia*, sendo favorecidos os genótipos que garantem o crescimento e reprodução desses organismos (Hairston *et al.*, 2001). Clones de *D. pulicaria* apresentaram diferenças na tolerância de cepas tóxicas de *Microcystis* de acordo com o nível trófico dos ambientes que foram isolados. Clones isolados de ambientes eutróficos foram mais resistentes que aqueles isolados de ambientes

oligotróficos (Sarnelle e Wilson, 2005). Dessa maneira, diferenças na sensibilidade entre clones e espécies de *Daphnia* a cianotoxinas podem ser um fator seletivo, determinando a composição do zooplâncton, favorecendo a capacidade competitiva de algumas espécies tolerantes em relação a outras espécies sensíveis (Ferrão-Filho *et al.*, 2007)

O clone *D. laevis* (Rio Doce) apresentou maior sensibilidade nos ensaios em relação aos outros clones nativos. Apesar deste clone provavelmente já ter entrado em contato com florações antes de ser cultivado em laboratório, a exposição à cianobactérias tóxicas não é necessariamente um pré-requisito à resistência (Wilson e Hay, 2007) e até mesmo clones considerados resistentes podem apresentar diferentes níveis de tolerância (Sarnelle *et al.*, 2010). Quando analisada a resposta de três clones de origem temperada (*D. pulex*, *D. publicaria* e *D. similis*) e três clones de origem tropical (*C. cornuta*, *M. micrura* e *M. minuta*) não foi encontrado um padrão que explicasse origem e sensibilidade dos cladóceros a cepas tóxicas de *M. aeruginosa* (Ferrão-Filho *et al.*, 2009). Entretanto, se *D. gessneri* e *D. laevis* (Ibirité) que demonstraram maior tolerância a *C. raciborskii* nos ensaios, têm uma resistência comportamental (como por exemplo, evitar/rejeitar filamentos) ou tolerância fisiológica a cepas produtoras de STX, ainda é desconhecido e são necessários mais estudos que investiguem a seletividade alimentar e ecofisiologia de diferentes clones de *Daphnia* quando expostas a *C. raciborskii*.

Novos estudos deveriam adotar uma abordagem que considere a separação de fatores que influenciam esses organismos como toxicidade, morfologia de *C. raciborskii*, seletividade e valor nutricional principalmente com espécies nativas, visto que no presente trabalho não foi possível concluir qual fator foi mais determinante para os efeitos negativos observados em *Daphnia* expostas à cepa CYLCAM-1.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que clones de *Daphnia* que apresentam uma alta taxa de herbivoria (*D. similis* e *D. laevis* (Rio Doce), ou seja, continuam se alimentando mesmo em dietas com proporções altas de cianobactéria, são menos tolerantes a exposição à CYLCAM-1 o que causaria efeitos deletérios no ciclo de vida desses organismos. Enquanto clones com baixa herbivoria (*D. gessneri* e *D. laevis* (Ibirité), que reduzem sua taxa de filtração na presença de cianobactéria, são mais tolerantes e parecem evitar ingerir filamentos, conseguindo coexistindo com *C. raciborskii* em condições em que não ocorram dominância dessa cianobactéria.

Nos ensaios realizados, espécies de *Daphnia* isoladas de ecossistemas brasileiros demonstraram diferentes níveis de sensibilidade (entre espécies e até entre clones da mesma espécie). O local de origem do cladóceros foi isolado, a pré exposição a florações e o tempo isolado do ambiente natural, mantido em cultivo de laboratório, poderiam explicar as diferentes tolerâncias desses clones a *C. raciborskii* observadas nesse estudo.

Em um cenário com mudanças climáticas e aumento da dominância de florações de cianobactérias, a comunidade zooplânctonica pode sofrer modificação de sua composição devido às diferenças de tolerância entre organismos. A redução da pressão de predação do zooplâncton no fitoplâncton pode favorecer cianobactérias tóxicas, excluindo espécies sensíveis, causando redução na diversidade de um ecossistema natural. Portanto, estudos utilizando espécies de *Daphnia* isoladas de ambientes aquáticos brasileiros são essenciais para nos ajudar a prever os resultados dessas mudanças.

REFERÊNCIAS

AFNOR - Association Française of Normalization (1980). Essais des eaux. Determination of inhibition of *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme Experimentale T90-304.

Antunes JT, Leão PN, Vasconcelos VM (2015) *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front. Microbiol.* 6:473.

Apeldoorn ME, Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 7-60.

Bednarska A, Pietrzak B., Pijanowska J (2014) Effect of poor manageability and low nutritional value of cyanobacteria on *Daphnia magna* life history performance. *J Plankton Res* 36:838–847.

Bonilla S, Aubriot L, Soares MCS et al (2012) What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol Ecol* 79:594–607.

Bouvy M, Falcão D, Marinho M, Pagano M, Moura A (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23:13-27.

Bouvy M, Molica R, Oliveira S, Marinho M, Becker B (1999) Dynamics of a toxic cyanobacterial Bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of Northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 285-297.

Bouvy M, Nascimento MS, Molica RJR, Ferreira A, Huskar V, Azevedo MFO (2003) Limnological features in tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. *Hydrobiologia* 493: 115-130.

Bouvy M, Pagano M, Troussellier M (2001) Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). *Aquatic Microbial Ecology* 25: 215–227.

Branco CWC, Cavalcanti CGB (1999) A ecologia das Comunidades Planctônicas no Lago Paranoá. In *Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais*. (R. Henry, ed.). Fapesp/Fundibio, Botucatu 573-595.

Branco CWC, Senna PAC (1994) Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies* 75:85-96.

Branco CWC, Senna PAC (1996) Relations among heterotrophic bacteria, chlorophyll-a, total phytoplankton, total zooplankton and physical and chemical features in the Paranoá reservoir, Brasília, Brazil. *Hydrobiologia* 337:171-181.

Branco SM, Azevedo SMFO, Tundisi JG. *Águas Doces no Brasil*. São Paulo: 2006.

Briand JF, Leboulanger C, Humbert JF, Bernard C, Dufour P (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40:231–238.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, et al. (2017) Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Toxicology* 91: 1049.

Burford MA, Beardall J, Willis A, Orr PY, Magalhaes VF, Rangel LM et al. (2016) Understanding the winning strategies used by the bloomforming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 54: 44–53.

Carmichael WW (1992) Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *Applied Bacteriology* 72: 445–454.

Carmichael WW, Azevedo SMFO, Na JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663-668.

Castro D, Vera D, Lagos N, García C, Vásquez M (2004) The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 44:483-489.

Charles S, Veber P, Delignette-Muller ML (2018) MOSAIC: a web-interface for statistical analyses in ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res.* 25: 11295.

Chonudomkul D, Yongmanitchai W, Theeragool G, Kawachi M, Kasai F, Kaya K et al. (2004) Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48(3): 345–355.

Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. 3. ed. Geneva: WHO - World Health Organization; 1999.

Christoffersen K (1996) Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35 (6): 42-50.

Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, Metcalf JS (2005) Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. *Harmful Cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 1-24.

Costa SM, Ferrão-Filho AS, Azevedo SMFO (2013) Effects of saxitoxin- and non-saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans. *Harmful Algae* 28: 55–63.

Costa, Simone Maciel da Costa. Efeitos de saxitoxinas produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* e de outras cianotoxinas sobre cladóceros (Branchiopoda). Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2005.

Demott WR (1989) The role of competition on zooplankton succession. In: U. Sommer (ed.). Plankton ecology: succession in plankton communities. Springer Verlag, Berlin 253-296.

DeMott WR, Müller-Navarra DC (1997) The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwater Biology* 38: 649-664.

Dias TM. Efeitos do séston e *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada de um reservatório naturalmente eutrófico (Reservatório do Camorim, RJ) sobre a história de vida de cladóceros. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2014. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical.

Diener M, Erler K, Hiller S, Christian B, Luckas B (2006) Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *European Food Research and Technology* 224(2): 147-151.

Dodson SI, Frey DG. Cladocera and other branchiopoda (2001) In: THORP, J. H.; COVICH, A. P. (Comp.). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. USA: Elsevier Science 21:850-865.

Eskinazi-Sant'Anna EM, Maia-Barbosa PM, Barbosa FAR (2002) On the natural diet of *Daphnia laevis* in the eutrophic Pampulha Reservoir (Belo Horizonte, Minas Gerais). *Brazilian Journal of Biology* 62(3)1-9.

Fabre A, Lacerot G, de Paiva RR, Soares MCS, Magalhães VF, Bonilla S (2017) South American PSP toxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) decreases clearance rates of cladocerans more than copepods. *Hydrobiologia* 785: 61.

Ferrão-Filho AS (2009) Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Oecol. Bras.* 13(2): 272-312.

Ferrão-Filho AS, Abreu SSD, Oliveira T, Magalhães VF, Pflugmacher S, Silva EM (2017) Single and combined effects of microcystin and saxitoxin producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9999: 1–9.

Ferrão-filho AS, Costa SM, Ribeiro MGL, Azevedo SMFO (2007) Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming movements of Cladocerans. *Environmental Toxicology* 161-168.

Ferrão-Filho AS, Costa SM, Ribeiro MGL, Azevedo SMFO (2008) Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environ. Toxicol.* 23:161-168.

Ferrão-Filho AS, Cunha R, Magalhães, VF, Soares MCS, Baptista DF (2007) Evaluation of sub-lethal toxicity of Cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 2(2): 93-99.

Ferrão-Filho AS, Domingos P, Azevedo SMFO (2002) Influences of a *Microcystis aeruginosa* Kützing bloom on zooplankton populations in Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Limnologica* 32: 295-308.

Ferrão-Filho AS, Koslowsky-Suzuki B (2011) Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 9: 2729-2772.

Ferrão-Filho AS, Soares MCS, Lima RS, Magalhães VF (2014) Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (Cladocera). *Environ Toxicol Chem* 31:223–229.

Ferrão-Filho AS, Soares MCS, Magalhães VF, Azevedo SMFO (2009) Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 479–489.

Ferrão-Filho, Soares MC, Magalhães VF, Azevedo SM (2010) A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Pollution* 158:2084-2093.

Fonseca AL. A Biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces Poeciidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais. Dissertação (Mestrado) - UFSCAR, São Carlos, 1991.

Garcia FC, Barbosa FAR, Braz S, Petrucio MM, Faria B (2009) Water quality of an urban reservoir subjected to periodic applications of copper sulphate: the case of Ibirité reservoir, southeast Brazil. *Acta Limnol Bras* 21:235-243.

Ger KA, Panosso R, Lürling M (2011) Consequences of acclimation to *Microcystis* on the selective feeding behavior of the calanoid copepod *Eudiaptomus gracilis*. *Limnology and Oceanography* 56: 2103–2114.

Ghadouani A, Pinel-Alloul B, Plath K (2004) Effects of *Microcystis aeruginosa* and purified microcystin-LR on the feeding behavior of *Daphnia pulex*. *Limnol Oceanogr* 49: 666-679.

Gillooly J , Dodson SI (2000) Latitudinal patterns in the size distribution and seasonal dynamics of new world, freshwater cladocerans. *Limnology and Oceanography* 45:22-30.

Gliwicz ZM, Siedlar E (1980) Food size limitation and algae interfering with food collection in *Daphnia*. *Arch. Hydrobiol.* 88: 155-177.

Gomes AMA, Pedro LS, Ferrão-Filho AS, Magalhães VF, Marinho MM, Oliveira ACP et al. (2009) Florações de cianobactérias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para a saúde humana *Oecol. Bras.* 13(2): 329-345

Granéli E, Turner JT (2006) Ecology of Harmful Algae. *Ecological Studies* 189. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg 413 pp.

Guillard RR (1975) Cultures of phytoplankton for feeding of marine invertebrates. In Smith, W. L & M. H. Chanley, (eds), Culture of Marine Invertebrate Animals. New York, Plenum: 29–60.

Hairston JNG, Holtmeier CL, Lampert W, Weider LJ, Post DM, Fischer JM et al. (2001) Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: Evolution of phenotypic plasticity? *Evolution* 55: 2203–2214.

Handee S, Rohrlack T, Ballot A, Roberg K, Skulberg R, Beck M et al. (2008) Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7:629-701.

Haney JF, Sasner JJ, Ikawa M (1995) Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnology and Oceanography* 40(2): 263-272.

Hansson L, Gustafsson S, Rengefors K, Bomark L (2007) Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biology* 52: 1290-1301.

Hart RC, Bychek EA (2011) Body size in freshwater planktonic crustaceans: an overview of extrinsic determinants and modifying influences of biotic interactions. *Hydrobiologia* 668:61-108

Havens KE, Hudnell HK (2008) Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems, Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. New York Springer 733-747.

Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR, (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 341–346.

Henriksen P, Carmichael WW, Na J, Moestrup O (1997) Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35: 901-913.

Herrera N, Palacio J, Echeverri F, Ferrão-Filho AS (2014) Effects of a cyanobacterial bloom sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. *Toxicology Reports* 1: 909-914.

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (2002) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35:403-424.

Hong YB, Michele AR, Peter JU, James W, Doblin MA (2013) Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* is facilitated by copepod selective grazing. *Harmful algae* 1568-9883

Humpage AR, Falconer IR (2003) Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male swiss albino mice: Determination of no observed adverse

effect level for a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology* 18: 94-103.

Huszar VLM, Silva LHS, Marinho MM, Domingos P, Sant'Anna, CL (2000) Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424:67-77.

INEPAC (Instituto Estadual do Patrimônio Cultural). Inventário de identificação dos reservatórios da CEDAE. Levantado por Ferraz MG, Mendonça MG, Veloso R (1998) Franco I (2006). Secretaria de Estado de Cultura, RJ.

Ishimi K, Suzuki T, Yamasaki M (2001) Non-selective of PSP toxins by the mussel *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon* 39: 1917-1921.

Jaconetti PCM. Validação de Ensaio Ecotoxicológicos com organismos Autoctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Nuclear - Materiais, Ipen, São Paulo, 2005

Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SMFO, Oshima Y (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.

Landsberg JH (2002) Toxins and harmful mechanisms. In: R. R. Stickney (ed), The effect of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Fishery Science* 10: 191-193.

Laurén-Mättä C, Hietala J, Walls M (1997) Responses of *Daphnia pulex* populations to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* 37:635-647.

Lei L, Peng L, Huang X, Han BP (2014) Occurrence and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* and dissolved cylindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply. *South China, Environ. Monit.*

Leonard JA, Pearl HW (2005) Zooplâncton community structure, micro-zooplâncton grazing impact, and seston energy content in the St. Johns river system, Florida as influenced by the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 537: 89-97.

Lynch M (1989) The evolution of cladoceran life histories. *O. Rev. Biol.* 55:23-42.

Magalhães VF, Marinho MM, Domingos AC, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO (2003) Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42: 289-295.

Magalhães VF, Soares RM, Azevedo SMFO (2001) Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085.

Marinho MM, Huszar VLM (2002) Nutrient availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southeastern Brazil). *Archiv für Hydrobiologie* 153:443-468.

Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O (2013) State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Internat* 59: 303–327.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil 12 dez 2011.

Miranda FS, Pinto-Coelho RM, Gonzaga AV (2013) Redução da riqueza de organismos do zooplâncton (com ênfase em Copepoda e Cladocera) nas lagoas do médio Rio Doce/MG. *Revista Brasileira de Zoociências* 15 (1, 2, 3): 69-90.

Molica R, Azevedo S (2009) Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecol. Bras.* 13(2): 229-231.

Molica R, Onodera H, Garcia C, Rivas M, Andrinolo D, Nascimento S et al. (2002) Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: 606-611.

Molica RJR, Oliveira EJA, Carvalho PVVC, Costa APNSF, Cunha MCC, Melo, GL et al. (2005) Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743–753.

Müller-Navarra DC, Brett MT, Liston AM, Goldman CR (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403: 74-77.

Nandini S, Sarma SSS, Ramirez-Garcia P (2000) Life table demography and population growth of *Daphnia laevis* (Cladocera, Anomopoda) under different densities of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 73:1273-1286.

NBR ABNT12713/2004 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda- Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera).

Negri AP, Jones GJ (1995) Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussels *Alathya condola*. *Toxicon* 33(5): 667-678.

Nogueira ICG, Lobo-da-Cunha A, Vasconcelos VM (2006) Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquat Toxicol* 80:194–203.

Nogueira ICG, Pereira P, Dias E, Pflugmacher S, Wiegand C, Franca S et al. (2004) Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicon* 44: 773–780.

Nogueira ICG, Saker ML, Pflugmacher S, Wiegand C, Vasconcelos VM, (2004) Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol* 19:453–459.

O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313–334.

Okumura DT, Sotero-Santos RB, Takenaka RA, Rocha O (2007) Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology* 16: 263-270.

O'Neill K, Musgrave IF, Humpage A (2016) Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 48: 7–16.

Padisák J, Reynolds CS (2003) Shallow lakes: the absolute, the relative, the functional and the pragmatic. *Hydrobiologia* 506/509: 1-11.

Paerl HW, Huisman J (2008) Blooms like it hot. *Science* 320: 57-58.

Panosso R, Kozlowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO, Graneli E (2003) Effect of grazing by a neotropical copepod, *Notodiaptomus*, on a natural cyanobacterial assemblage and on toxic and non-toxic cyanobacterial strains. *Journal of Plankton Research* 25: 1169–1175.

Panosso R, Lürling M (2010) *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *Journal of Plankton Research* 10: 1393–1404.

Pearson L, Mihali T, Moffit M, Kellmann R, Neilan B (2010) On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8(5): 1650-1680.

Peters RH (1984) Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In Downing, J. A. & F. H. Rigler (eds), *A Manual for the Assessment of Secondary Production in Fresh Waters*. 2 ed. Blackwell, Oxford: 336–412.

Piccini C, Aubriot L, Fabre A, Amaral V, González-Piana M, Figueiredo CC et al. (2011) Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10:644–653.

Pinto-Coelho RM, Bezerra-Neto JF, Giane A, Macedo CF, Figueiredo CC, Carvalho EA (2003) The Collapse of a *Daphnia laevis* (Birge, 1878) population in Pampulha Reservoir, Brasil. *Acta Limnologica Brasiliensis* 3(15): 53-70.

Pomati F, Neilan BA, Suzuki T, Manarolla G, Rossett C (2003) Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *Journal of Phycology* 39: 535-542.

Porter KG, Orcutt JD (1980) Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for *Daphnia*. *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. New England: Hanover University Press 268–281.

Rangel LM, Ger KA, Silva LHS, Soares MCS, Faassen EJ, Lürling M (2016) Toxicity Overrides Morphology on *Cylindrospermopsis raciborskii* Grazing Resistance to the Calanoid Copepod *Eudiaptomus gracilis*. *Microb Ecol*. 71:835–844.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn, SE. *Biologia Vegetal*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans; 2001.

Repka S, Veen A, Vijverberg J (1999) Morphological adaptations in filtering screens of *D. galeata* to food quantity and food quality. *J. Plankton Res*. 21: 971–989.

Restani GC, Fonseca AL (2014) Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains (Woloszynska, 1912) Senayya & Subba Raju on the mobility of *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphniidae). *Braz. J. Biol*. 74(1): 23-31.

Restani GC. Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphniidae). Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2011. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Rocha O, Duncan A (1985) The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *J Plankton Res*. 7:279–294.

Rodrigue DC, Etzel RA, Hall S, de Porras E, Velasquez OH, Tauxe RV et al. (1990) Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 4.

Ruppert EE, Barnes RD, Fox RS. *Zoologia dos Invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca Brasil; 1996

Rzyski P, Poniedziałek B (2014) In search of environmental role of cylindrospermopsin: a review on global distribution and ecology of its producers. *Water Res*. 66:320–327.

Sant'Anna CL, Azevedo MTP (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* 71:359-385.

Sarnelle O, Gustafsson S, Hansson LA (2010) Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* 32: 471-477.

Sarnelle O, Wilson AE (2005) Local adaptation of *Daphnia pulex* to toxic cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr*. 50:1565–1570.

Schwarzenberger A, Christian J, Von Elert KE (2013) Molecular mechanisms of tolerance to cyanobacterial protease inhibitors revealed by clonal differences in *Daphnia magna*. *Molecular Ecology* 21(19):4898-4911.

Silva, LAPD. Efeitos de florações de cianobactérias sobre os cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia gessneri*. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

Sivonen K (2000) Freshwater cyanobacterial neurotoxins: ecobiology, chemistry, and detection. In: Botana, L. M., (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 567-581.

Soares MCS, Lürling M, Panosso R, Huszar V (2009) Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ.* 72:1183–1189.

Soares RM, Magalhães VF, Azevedo MFO (2004) Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 70: 1-10.

Stewart I., Seawright AA, Shaw GR (2008) Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds—an overview, in: *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*, Springer, New York, 613-637.

Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken JW. (Ed.). *Zoologia Geral*. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 2002.

Sun J, Liu D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331–1346.

Taberner A, Castañera P, Silvertre E, Dopazo J (1993) Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling Approaches. *Comput. Appl. Biosci.* 9:535-540.

Tillmanns AR, Burton SK, Pick FR (2011) *Daphnia* Pre-Exposed to Toxic *Microcystis* Exhibit Feeding Selectivity. *Hydrobiology* 96:20-28.

Tillmanns AR, Wilson AE, Pick FR, Sarnelle O (2008) Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses. *Hydrobiology* 171/4:285-295.

Tollrian R (1993) Neckteeth formation in *Daphnia pulex* as an example of continuous phenotypic plasticity: morphological effects of *Chaoborus kairomone* concentration and their quantification. *Journal of Plankton Research* 15(11): 1309 – 1318.

Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD et al. (1996) Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317-1321.

Von Elert E (2003) Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1764-1773.

Wacker A, Vonekert E (2001) Polyunsaturated fatty acids: Evidence for non-substitutable biochemical resources in *Daphnia galeata*. Ecology 82: 2507-2520.

Whitton BA, Potts M (2000) The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space. Dordrecht, London, Boston: Kluwer Academic Publishers. 669p.

Wiegand C, Pflugmacher S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology 203:201-218.

Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt M, Neilan BA (2010) Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. Mar. Drugs 8(7): 2185–2211.

Wilson AE, Hay ME (2007) A direct test of cyanobacterial chemical defense: Variable effects of microcystin-treated food on two *Daphnia pulicaria* clones. Limnol. Oceanogr. 52:1467–1479.

Wilson AE, Sarnelle O, Tillmanns AR (2006) Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. Limnol. Oceanogr. 51:1915–1924.

Wood SA, Stirling DJ (2003) First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res. 37: 821–828.

Yu SZ (1989) Drinking water and primary liver cancer. Pp. 30-37. In: Z.Y. Tang, M.C. Wu & S.S. Xia (eds.), Primary Liver Cancer. China Academic Publishers, New York. 360p.

Yunes JS, Cunha NT, Barros LP, Proença LAO, Monserrat JM (2003) Cyanobacterial neurotoxins from southern Brazilian freshwater. Comments on toxicology, 9: 103-115.