

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Nathan Eugeni Andolfato

Plasticidade morfológica em microalgas verdes do gênero  
*Ankistrodesmus* induzida por compostos liberados por *Daphnia*  
*magna*

São Carlos – SP

12/06/2020

Nathan Eugeni Andolfato

Plasticidade morfológica em microalgas verdes do gênero  
*Ankistrodesmus* induzida por compostos liberados por *Daphnia*  
*magna*

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia  
e Recursos Naturais da Universidade  
Federal de São Carlos, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM ECOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS.

Orientadora: Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini

Coorientadora: Emanuela Cristina de Freitas

São Carlos – SP

12/06/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Nathan Eugeni Andolfato, realizada em 12/06/2020.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini (UFSCar)

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira (UFSCar)

Profa. Dra. Mariana Rodrigues Amaral da Costa (UFRN)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha amada família, que me deu todo o suporte necessário para conseguir realizar cada passo da minha vida, incluindo o mestrado.

Um agradecimento mais que especial aos meus avós maternos, Amélia e Adolfo, por sempre serem meu maior exemplo de vida e por me direcionar ao que sou hoje. Sei que, independentemente de onde estiverem hoje, sempre estarão ao meu lado iluminando meu caminho e pensamentos nos momentos mais difíceis, permitindo que eu alcance várias realizações durante a minha vida. Amo muito vocês, carrego vocês comigo no coração a todo o momento. Obrigado por tudo! Esse trabalho é dedicado especialmente para vocês.

À Dra. Inessa Lacativa Bagatini, minha orientadora, pela amizade, parceria e paciência durante todos os 5 anos em que estive no Laboratório de Ficologia da UFSCar. Foram vários anos de cooperatividade e aprendizagem desde os tempos em que eu ainda estava na graduação, trabalhando comigo e me orientando também na minha Iniciação Científica e no meu TCC.

À minha co-orientadora Emanuela Freitas por me ensinar a cultivar a *Daphnia magna*, me ajudando também em eventuais dúvidas sobre a manutenção desses cladóceros.

Ao Luiz, técnico do laboratório, por todas as conversas e risadas, sempre alegrando o ambiente de trabalho. Agradeço também por todo o suporte e assistência necessária para aprimorar meu aprendizado dia a dia no laboratório.

Aos meus amigos e colegas de laboratório com quem tive o prazer de compartilhar os momentos todos os dias: Ana Beatriz, Ana Elisa, Guilherme, Helena, Ingritt, Inessa, Jéssica, Letícia, Luis, Marcelo, Naiara, Suzana, Thaís e Xico.

Aos meus amigos externos ao laboratório: Barretos, Barbosa, Brilhante, Jacque, Leo, Marcelo, Marcelinho, Melissa, Nicholas, Pedro e o Vitão, que me ajudaram muito durante o mestrado, seja pelas reuniões em bares da cidade,

pelas conversas, risadas e festas. Também aos meus amigos do cursinho Giber, Gustavo Z, Hick, Iuri, Jorge, Renan e Vitor pela união do grupo e eventuais reencontros até hoje, desde de 2012. Agradeço a todos os meus outros amigos que, de alguma forma, fizeram parte disso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos nos 24 meses de mestrado. E ao CNPq pelo financiamento do projeto (427777/2018-6) no qual se insere este trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), pela oportunidade de aprimoramento científico.

## Resumo

A plasticidade fenotípica no fitoplâncton pode ser um mecanismo de defesa contra a predação, afetando diretamente produtores e consumidores primários e a cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. No entanto, a plasticidade morfológica como mecanismo defensivo é uma defesa induzida observada em apenas alguns grupos de microalgas. Alguns estudos documentaram que a defesa induzida no fitoplâncton pode ser desencadeada apenas pela presença de produtos liberados por microcrustáceos herbívoros, os cairomônios, mesmo na ausência do predador. No entanto, poucos estudos abordam a plasticidade morfológica induzida por predação nas microalgas verdes cosmopolitas da família Selenastraceae. Neste estudo, avaliamos a variação morfológica (comprimento e largura) em 4 espécies diferentes de 8 linhagens de microalgas do gênero *Ankistrodesmus* sob o efeito dos cairomônios por um cladócero, *Daphnia magna*. Os resultados mostraram que a presença dos cairomônios liberados pelo predador induziu um aumento no comprimento e largura das células da maioria das cepas de *Ankistrodesmus*. A largura aumentou mais acentuadamente que o comprimento, o que pode estar relacionado à orientação da ingestão de células pelo predador. Como reportado em outro estudo para uma cepa de *A. falcatius*, também não encontramos manutenção da colônia ou agregação celular como uma importante plasticidade morfológica. No entanto, os resultados sugerem que em uma única cepa de *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 605) houve formação de colônia na presença dos cairomônios excretados pelo cladócero. Apesar das diferenças em relação ao tempo, intensidade de resposta e tipo de alteração induzida, todas as 8 cepas (4 espécies) do gênero *Ankistrodesmus* estudadas apresentaram algum tipo de plasticidade fenotípica na presença dos cairomônios do predador. Este é o primeiro relato de alteração no tamanho celular de *Ankistrodesmus* sob influência de predação do zooplâncton (cairomônios). Os resultados são importantes para entender a ecologia dessas microalgas e destaca a importância de estudos ecológicos para uma melhor descrição das características morfológicas utilizadas para a taxonomia das microalgas verdes cocóides.

**Palavras-chave:** Plasticidade Fenotípica. Defesa Induzida. *Ankistrodesmus*. *Daphnia magna*. Cairomônios.

## Abstract

Phenotypic plasticity in phytoplankton can be a defense mechanism against predation, directly affecting primary producers and consumers and the food chain of aquatic ecosystems. However, morphological plasticity as a defensive mechanism is an observed induced defense in only a few groups of microalgae. Some studies have documented that the defense induced in phytoplankton can be triggered merely by the presence of products released by herbivorous microcrustaceans, the kairomones, even in the absence of the predator. However, rare studies address predation-induced morphological plasticity in the cosmopolitan green microalgae of the family Selenastraceae. In this study, we evaluated the morphological variation (length and width) in 4 different species of 8 strains of microalgae of the genus *Ankistrodesmus* under the effect of kairomones by a cladoceran, *Daphnia magna*. The results showed that the presence of kairomones released by the predator induced an increase in the length and width of the cells of most strains of *Ankistrodesmus*. The width increased more sharply than the length, which may be related to the orientation of cell intake by the predator. As reported in another study for an *A. falcatus* strain, we found no colony maintenance or cell aggregation as an important morphological plasticity. However, the results suggest that a single strain of *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 605) produced colonies in the presence of kairomones excreted by the cladoceran. Despite the differences in time, intensity of response and type of induced change, all 8 strains (4 species) of the genus *Ankistrodesmus* studied showed some type of phenotypic plasticity in the presence of the predator's kairomones. This is the first report of changes in *Ankistrodesmus* cell size under the influence of zooplankton predation (kairomones). The results are important to understand the ecology of these microalgae and highlight the importance of ecological studies for a better description of the taxonomic characteristics of the coccoid green microalgae.

**Keywords:** Phenotypic Plasticity. Induced Defense. *Ankistrodesmus*. *Daphnia magna*. Kairomones.

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do delineamento experimental para cada cepa de microalga verde do gênero *Ankistrodesmus* estudada. As linhas azuis representam a Etapa 1, enquanto as linhas vermelhas representam a Etapa 2. Na Etapa 1, dois tipos de culturas foram preparados para obter os excretados da predação pelo predador: Excretado do Zooplâncton (EZ), com a adição de 15 indivíduos de *Daphnia magna*, e Controle do Excretado (EC), com a adição de 2% ( \* ) do meio de cultura onde os cladóceros foram cultivados (portanto, incluía outros microrganismos). Para a Etapa 2 (após a filtração sequencial), duas outras culturas foram preparadas para avaliar a plasticidade fenotípica em cepas de algas a partir do excretado obtido na etapa anterior: Tratamento (TZ) e Controle (C). Ao todo, foram realizadas três amostragens para análise em microscopia e citometria: primeiras horas de cultivo (T1), 48h (T2) e 120h (T3). As culturas na Etapa 2 foram realizadas em triplicatas.....pag. 12

Figura 2. Esquema das medidas de comprimento (a) e a largura (b) das células de *Ankistrodesmus*. Nas células curvas, a medida de comprimento foi realizada seguindo a curvatura celular (Fonte: [www.planktonforum.eu](http://www.planktonforum.eu)).....pag. 13

Figura 3. Variação no comprimento celular ( $\mu\text{m}$ ) das cepas de *Ankistrodesmus* no controle (branco) e no tratamento com adição de infoquímicos dos cladóceros (cinza) em três tempos de cultivo. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamento e controle são indicadas pelo asterisco ( \* ). Para cada tempo amostral  $n = 90$  células (30 por réplica) .....pag. 17

Figura 4. Variação na largura celular ( $\mu\text{m}$ ) das cepas de *Ankistrodesmus* no controle (branco) e no tratamento com adição de infoquímicos dos cladóceros (cinza) em três tempos de cultivo. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamento e controle são indicadas pelo asterisco ( \* ). Para cada tempo amostral  $n = 90$  células (30 por réplica).....pag. 18

Figura 5. Proporção de aumento do comprimento celular (%) das cepas de *Ankistrodesmus* do tratamento em relação ao controle nos tempos em que é essa diferença foi significativa (ver Figura 3) para cada cepa. T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h) .....pag. 19

Figura 6. Proporção de aumento da largura celular (%) das cepas de *Ankistrodesmus* do tratamento em relação ao controle nos tempos em que é essa diferença foi significativa (ver Figura 4) para cada cepa. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h).....pag. 19

Figura 7. Exemplo de variação no comprimento celular da cepa CCMA-UFSCar 003 no T2 entre controle (a) e o tratamento (b). As imagens foram obtidas com uma câmera *Zeiss AxioCam HRc* utilizando software *Axiovision 4.5* acoplada no microscópio ótico *Zeiss Axioplan*.....pag. 20

Figura 8. Exemplo de variação da largura celular da cepa CCMA-UFSCar 176 no T2 entre controle (a) e o tratamento (b). As imagens foram obtidas com uma câmera *Zeiss AxioCam HRc* utilizando software *Axiovision 4.5* acoplada no microscópio ótico *Zeiss Axioplan*.....pag. 21

Figura 9. Densidade de indivíduos das cepas de *Ankistrodesmus* (células + colônias) que apresentaram diferença significativa entre o tratamento e o controle analisada pela citometria de fluxo nos tempos T2 e T3. Foi considerado como diferença significativa o valor de  $p < 0,05$  ( \* ).....pag. 23

Figura 10. Tamanho celular (FSC-H) das cepas de *Ankistrodesmus* (células + colônias) que apresentaram diferença significativa entre o tratamento e o controle analisada pela citometria de fluxo nos tempos T2 e T3. Foi considerado como diferença significativa todo valor de  $p < 0,05$  ( \* ). Os valores de FSC-H são arbitrários .....pag. 24

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies e cepas de microalgas utilizadas neste estudo, indicando também o local (incluindo coordenadas geográficas) e a ano de isolamento dos organismos. As cepas foram mantidas e cultivadas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), com exceção da cepa CB 2009/30, proveniente da Coleção de Culturas pessoal da Dra. Christina Bock (CB), da Universidade Duisburg-Essen, Alemanha.....pag. 7

## Sumário

1	Introdução.....	1
2	Hipóteses.....	4
3	Objetivos .....	5
	3.1 <i>Objetivo específico</i> .....	5
4	Materiais e métodos.....	5
	4.1 <i>Microalgas utilizadas</i> .....	5
	4.2 <i>Biomassa algal para os cultivos experimentais</i> .....	8
	4.3 <i>Cultivo e manutenção dos cladóceros</i> .....	8
	4.4 <i>Delineamento experimental</i> .....	9
	4.5 <i>Microscopia, Citometria e Análises Estatísticas</i> .....	13
5	Resultados.....	14
	5.1 <i>Comprimento e largura celular obtidos por microscopia</i> .....	14
	5.2 <i>Densidade e tamanho de indivíduos obtidos por citometria</i> .....	20
6	Discussão .....	25
7	Conclusão.....	29
	Referências .....	30

## 1 Introdução

As algas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos porque, como produtores primários, são uma parte importante na base da cadeia alimentar (FALKOWSKI et al., 2004). Sendo assim, qualquer efeito sobre elas pode afetar os níveis tróficos mais altos e, conseqüentemente, impactar o funcionamento do ecossistema (DELORENZO et al., 2002).

Nos ecossistemas aquáticos, o zooplâncton é um dos principais consumidores do fitoplâncton, influenciando diretamente na transferência de energia para outros níveis tróficos (YANG et al., 2016). Sendo assim, a predação, em conjunto com a competição, é uma das principais interações bióticas que organiza e estrutura uma comunidade, podendo afetar diretamente as populações de produtores e consumidores primários (LÜRLING, 2003).

Além da importância ecológica, a relação entre zooplâncton herbívoro e fitoplâncton possui também uma importância econômica, especialmente na aquicultura. Por se tratar de uma alternativa com um investimento menor, muitos estudos buscam o alimento ideal que potencialize o desenvolvimento do zooplâncton, já que esses organismos aquáticos são utilizados como alimentos vivos para assegurar a sobrevivência dos peixes, especialmente nas etapas iniciais de seus desenvolvimentos (ORBE et al., 2020).

Os organismos zooplânctônicos predadores podem se alimentar de várias espécies de fitoplâncton em sistemas aquáticos, mas a capacidade e a taxa de predação dependem de várias características da presa, como tamanho corporal, composição celular, densidade, forma, estrutura da parede celular e produção de toxinas (CYR; CURTIS, 1999; LACEROT et al., 2013; VAN DONK; IANORA; VOS, 2011). Essas características variam entre espécies de fitoplâncton, mas também ocorrem variações intraespecíficas, tanto por variabilidade genética da população, como por plasticidade fenotípica (VIOLLE et al., 2012). A plasticidade fenotípica é a capacidade que alguns organismos apresentam de, com apenas um genótipo, produzir variações morfológicas, fisiológicas e comportamentais de acordo com as condições ambientais (WEST-EBERHARD, 1989).

As mudanças fenotípicas estão diretamente relacionadas a sinais associados com agentes bióticos (ADLER; DREW HARVELL, 1990) ou abióticos. Qualquer alteração morfológica causada por esses fatores externos pode ter influência direta na taxa de predação pelos predadores e na aquisição de recursos devido à alteração do tamanho ou do formato da célula (LITCHMAN; KLAUSMEIER, 2008; LÜRLING, 2003). As alterações induzidas por agentes bióticos ocorrem usualmente para diminuir os ataques causados por predadores (TOLLRIAN, R.; HARVELL, 1999). Assim, a luta pela sobrevivência do fitoplâncton envolve, entre outros mecanismos, a plasticidade fenotípica para se defender dos predadores, trazendo consequências para as cascatas tróficas nos sistemas aquáticos (AGRAWAL, 1998; VAN DONK, 2007).

A plasticidade do fitoplâncton em resposta à predação ocorre porque a interação entre predador e presa resulta na liberação de compostos bioativos (mensageiros químicos) pelo zooplâncton, entre eles os caimônios (*kairomones*) (BROWN, JR.; EISNER; WHIUAKER, 1970). Esses infoquímicos excretados pelos predadores transmitem informações entre indivíduos, causando uma resposta comportamental ou fisiológica na presa receptora (DICKE; SABELIS, 1988). A consequência da presença dos caimônios sobre a plasticidade fenotípica de outras algas verdes já foi documentada (HESSEN; VAN DONK, 1993; LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994).

Para evitar a predação, muitas espécies de fitoplâncton desenvolvem diferentes mecanismos defensivos induzíveis ou induzidos (VAN DONK, 1997) que envolvem não somente alterações morfológicas, mas também alterações na taxa de crescimento e em sua composição bioquímica (LÜRLING; VAN DONK, 1997; VAN DONK; IANORA; VOS, 2011). Entre as alterações morfológicas desencadeadas pela resposta a pressão de seleção de algum agente biótico, podemos citar a mudança no tamanho celular, produção ou aumento de espinhos, formação de colônias e aumento da espessura da parede celular e mucilagem (ADLER; DREW HARVELL, 1990; BERGKVIST, 2012; LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994; LASS S.; SPAAK P., 2003; LÜRLING; VAN DONK, 1997; VAN DONK, 2007; VAN DONK; IANORA; VOS, 2011). Essas alterações induzidas tornam-se importantes fatores ecológicos que também afetam diretamente a interação trófica em ambientes aquáticos.

Na literatura, grande parte dos trabalhos de defesa induzida por predadores explora a plasticidade da microalga do gênero *Scenedesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). Um exemplo clássico dessa influência foi documentado no trabalho de HESSEN e VAN DONK (1993). Neste estudo, quando a alga *Scenedesmus subspicatus* foi exposta à água filtrada do cultivo de *Daphnia magna*, foram formadas colônias cenobiais de 4-8 células, com espinhos maiores e mais rígidos (HESSEN; VAN DONK, 1993). Os mesmos autores constataram que a taxa de predação do cenóbio foi menor do que a morfologia unicelular, devido ao aumento do tamanho do primeiro. LAMPERT e colaboradores (1994) encontraram resultados parecidos utilizando também a água filtrada do predador, mas com *Scenedesmus acutus* (LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994). Trabalhos posteriores mostraram ainda que infoquímicos produzidos por predadores, além de induzir o prolongamento dos espinhos e formação de colônias, induziu também mudanças no conteúdo lipídico de microalgas da família Scenedesmaceae (Sphaeropleales) (LÜRLING; BEEKMAN, 1999; LÜRLING; DE LANGE; VAN DONK, 1997).

Muitos estudos sobre interação zooplâncton-fitoplâncton utilizam os cladóceros como predadores (KAMPE et al., 2007; LAMPERT, 2006; LASS S.; SPAAK P., 2003), que são, de fato, um dos principais organismos pertencentes à comunidade zooplânctonica. Esses organismos são perfeitamente adequados para experimentos ecológicos, pois trata-se de animais que são clonáveis, apresentam um tempo de geração curto e podem ser mantidos em grande quantidade em laboratórios (TOLLRIAN, R.; DODSON, 1999). Um dos cladóceros mais comumente utilizado é a *Daphnia magna* STRAUS, 1820, cujo diferencial em relação aos demais cladóceros é que possuem neonatas grandes e de fácil observação nos cultivos em laboratório (RAND, 1995).

Grande parte dos organismos do fitoplâncton de água doce pertence à ordem Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta) (KRIENITZ; BOCK, 2012). Embora muitos estudos de plasticidade morfológica tenham sido realizados com um gênero desta ordem (*Scenedesmus*), estudos com outros gêneros são escassos. Dentro de Sphaeropleales, a família Selenastraceae agrupa microalgas verdes que se reproduzem assexuadamente e que são ubíquas em ambientes de água doce (KRIENITZ; BOCK, 2012). Nessa família encontram-se gêneros de microalgas verdes de relevância ecológica, como *Raphidocelis*

Hindák, *Kirchneriella* Schimidle, *Selenastrum* Reinsch, *Monoraphidium* Komárková-Legnerová e *Ankistrodemus* Corda. Esses organismos apresentam uma organização celular simples (GARCIA et al., 2017; KRIENITZ; BOCK, 2012) e a simplicidade morfológica facilita a ocorrência de espécies crípticas e convergência morfológica (KRIENITZ; BOCK, 2012), dificultando muitas vezes sua correta identificação.

Embora a plasticidade fenotípica para a família Selenastraceae seja estimulada por variações abióticas (WANG; LIU; CHEN, 2005), esse fenômeno ainda é pouco explorado, mesmo sendo um fator complicador para a identificação desses organismos (TREVIÑO, 2008). Sabe-se ainda menos sobre o efeito da predação na morfologia de importantes gêneros dessas famílias, cosmopolitas em ambientes de água doce, como o gênero *Ankistrodesmus* Corda.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho auxiliam no entendimento das interações entre predador-presa que podem ocorrer especialmente nos ambientes de água doce, ampliando o conhecimento sobre a ecologia dos organismos estudados. Além disso, fornecem informações a serem consideradas para fins taxonômicos, incluindo a delimitação de espécies do gênero.

## 2 Hipóteses

1. A plasticidade fenotípica induzida por cairomônios ocorre em outras espécies pertencentes à ordem Sphaeropleales, tanto em relação à formação de colônias (HESSEN; VAN DONK, 1993; LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994), como alterações do tamanho celular. Embora os escassos trabalhos realizados com espécies do gênero *Ankistrodesmus* não tenham documentado formação ou manutenção de colônias (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999), outras análises morfométricas não foram avaliadas. Assim, mesmo que não ocorra formação ou aumento do tamanho de colônias neste gênero, é possível ainda que ocorra plasticidade em seu tamanho celular.

2. Além disso, embora existam poucos estudos com plasticidade fenotípica induzida por predação em diferentes cepas da mesma espécie, os

gêneros mais estudados (*Scenedesmus* e *Desmodesmus*) apresentam variação na resposta entre diferentes cepas (LURLING, 2003). Desta forma, é possível que haja variação entre cepas isoladas de locais diferentes e entre espécies do gênero *Ankistrodesmus* quando estas são diretamente expostas aos cairomônios excretados pelo predador. ]

### **3 Objetivos**

Verificar a ocorrência de plasticidade morfológica em *Ankistrodesmus*, importante gênero de microalga da família Selenastraceae (Sphaeropleales), induzida por cairomônios liberados por um cladócero predador. Comparar as respostas à presença dos cairomônios entre diferentes cepas e espécies de um mesmo gênero.

#### *3.1 Objetivo específico*

Avaliar as alterações morfológicas (tamanho celular e formação de colônias) em oito cepas de microalgas de quatro diferentes espécies do gênero *Ankistrodesmus* induzidas por cairomônios liberados durante a predação por um cladócero, *Daphnia magna*.

### **4 Materiais e métodos**

#### *4.1 Microalgas utilizadas*

As oito cepas axênicas de microalgas gênero *Ankistrodesmus* (Selenastraceae, Chlorophyceae, Chlorophyta) utilizadas neste trabalho (Tabela 1) foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar, World Data Centre for

Microorganisms 835), Laboratório de Ficologia, com exceção de uma cepa (CB 2009/30) proveniente da Coleção de Culturas pessoal da Dra. Christina Bock (CB), da Universidade Duisburg-Essen, Alemanha.

Tabela 1. Espécies e cepas de microalgas utilizadas neste estudo, indicando também o local (incluindo coordenadas geográficas) e a ano de isolamento dos organismos. As cepas foram mantidas e cultivadas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), com exceção da cepa CB 2009/30, proveniente da Coleção de Culturas pessoal da Dra. Christina Bock (CB), da Universidade Duisburg-Essen, Alemanha.

Espécie	Cepa	Local e data de isolamento	Coordenadas geográficas
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Korshikov 1953	CCMA-UFSCar 024	Represa do Broa, São Paulo, Brasil, 1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953	CCMA-UFSCar 003	Represa do Broa, São Paulo, Brasil, 1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953	CCMA-UFSCar 128	Represa de Itaipu, São Paulo, Brasil, 2009	25°23'56.1"S 54°35'26.2"W
<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953	CCMA-UFSCar 239	Represa Matão, São Paulo, Brasil, 2010	21°38'31.0"S 48°19'56.8"W
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda 1838	CCMA-UFSCar 605	Sítio Ypê, São Paulo, Brasil, 2013	23°15'25.7"S 47°18'18.6"W
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda 1838	CB 2009/30	Tanque de água, Nakuru, Quênia, 2009	0°20'39.6"S 36°11'02.5"E
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> Komárková-Legnerová 1969	CCMA-UFSCar 176	Lagoa do Infernã, São Paulo, Brasil, 1993	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> Komárková-Legnerová 1969	CCMA-UFSCar 277	Lagoa Vitória, Minas Gerais, Brasil, 2011	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W

#### 4.2 Biomassa algal para os cultivos experimentais

As cepas para obtenção de biomassa para os cultivos experimentais foram mantidas em meio WC pH 7,0 (GUILLARD; LORENZEN, 1972) a  $23 \pm 1$  °C,  $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provenientes de lâmpadas fluorescentes e fotoper\u00edodo de 12:12 horas. Todo o procedimento de transfer\u00eancia de in\u00f3culos ocorreu em uma cabine de Fluxo Laminar Horizontal VLFS-12 (VECO, Brasil) para limitar contamina\u00e7\u00e3o com outros microrganismos. Antes dos experimentos, al\u00edquotas das cepas foram transferidas tamb\u00e9m para meio WC com peptona e glicose (BAGATINI et al., 2014) para certificar que as condi\u00e7\u00f5es de cultivo se mantiveram ax\u00e9nicas.

Para todas as algas foram realizadas curvas de crescimento nas condi\u00e7\u00f5es descritas acima, com concentra\u00e7\u00e3o inicial de  $1 \times 10^4$  c\u00e9lulas.mL<sup>-1</sup>, contadas em hemoc\u00edmetro Fuchs-Rosenthal. As amostragens para obten\u00e7\u00e3o da curva de crescimento foram realizadas em dias intercalados durante 20 dias (Anexo 1). O crescimento das algas foi analisado por meio da concentra\u00e7\u00e3o de clorofila *a* in vivo em Fluor\u00edmetro Trilogy<sup>®</sup> (Turner Designs, Sunnyvale, USA) e absorv\u00eancia em 680 e 750 nm (GRIFFITHS et al., 2011), em espectrofot\u00f4metro DR 5000<sup>TM</sup> (Hach, Alemanha), para a obten\u00e7\u00e3o da curva e determina\u00e7\u00e3o da fase de crescimento exponencial de cada microalga. Para os experimentos, novos cultivos foram realizados nas mesmas condi\u00e7\u00f5es e a biomassa algal foi recuperada no final do crescimento exponencial (oitavo dia de cultivo).

#### 4.3 Cultivo e manuten\u00e7\u00e3o dos clad\u00f3ceros

O microcrust\u00e1ceo planct\u00f4nico *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda, Daphniidae) foi utilizado como predador das microalgas neste trabalho. Essa esp\u00e9cie, que possui entre 5 mm a 6 mm de comprimento em sua fase adulta, atua como consumidor prim\u00e1rio na cadeia alimentar aqu\u00e1tica (ABNT, 2016), alimentando-se por filtra\u00e7\u00e3o de material org\u00e2nico particulado em suspens\u00e3o por meio de correntes de \u00e1gua (PAU et al., 2012).

A *D. magna* foi cultivada de acordo com ABNT (2016) e U.S.EPA (2002). Para manutenção dos cladóceros, a microalga utilizada para alimentação foi *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindak (NIVA-CHL1, tombada sob o código CCMA-UFSCar 048), cultivadas em meio CHU-12 (MULLER, 1972), a uma concentração de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> (BAIRD et al., 1989), contadas no hemocitômetro.

O meio de cultivo preparado para a manutenção da *D. magna* será denominado neste trabalho como meio de cultivo de zooplâncton (MCZ), e foi armazenado em galões com capacidade de 20 L e constantemente aerados para homogeneização das soluções durante todo o tempo após a sua preparação. A dureza da água (método titulométrico com EDTA), assim como o pH (pHmetro DM-22, Digimed, Brasil) foram medidos após, no mínimo, 12h de aeração. Para *D. magna*, a água reconstituída utilizada foi a do tipo dura, com dureza total equivale à 175 a 225 mg CaCO<sub>3</sub>/L (ASTM, 2001).

Para os cultivos do cladóceros foram adicionados entre 25 - 30 indivíduos em béqueres de vidro de 1L, que foram mantidos sob iluminação de 150  $\mu\text{mol}$  fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> provenientes de lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos os cultivos de *D. magna* eram iniciados com indivíduos neonatos (idade  $\leq 24$  h) da terceira a quinta ninhada de fêmeas adultas.

#### 4.4 Delineamento experimental

O experimento para avaliar a influência dos compostos liberados por *D. magna* na morfologia das 8 cepas de microalgas foi realizado em duas etapas.

A Etapa 1 foi realizada para obtenção dos meios de cultivo com os infoquímicos liberados pelos cladóceros durante a predação de cada uma das algas a ser avaliada. A Etapa 2 consistiu no experimento para avaliar o efeito desses infoquímicos sobre caracteres morfológicos das cepas algais. As etapas do desenho experimental estão brevemente ilustradas na Figura 1.

## Etapa 1

Para a Etapa 1 cada cepa de microalga foi previamente cultivada como descrito anteriormente (seção “Biomassa algal para cultivos experimentais”) e coletada por centrifugação a 1147 xg durante 10 min (20 - 25 °C) (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Alemanha). As células foram contadas em hemocítômetro, e cada microalga inoculada em Béqueres (500 mL de WC) a uma concentração de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> em 2 condições diferentes (Figura 1, dia 8), como descrito abaixo.

Na primeira condição (denominada EZ, excretado do zooplâncton), cada microalga foi inoculada juntamente com 15 indivíduos de *D. magna* (concentração proporcional aos cultivos para manutenção na seção “Cultivo e manutenção dos cladóceros”) em meio WC pH 7,0. Esse cultivo forneceu o excretado proveniente da predação a ser usado no “tratamento” da Etapa 2, com cairomônios liberados durante a interação predador-presa (BROWN, JR.; EISNER; WHIUAKER, 1970) para cada uma das cepas.

Todas as *Daphnia* utilizadas na primeira condição da Etapa 1 foram selecionadas da 5ª ninhada de fêmeas adultas e apresentavam seis dias de vida quando foram inoculadas com as cepas de *Ankistrodesmus*. Previamente à introdução no meio com as algas, foram mantidas em cultivo sem alimentação por 12 horas.

A segunda condição forneceu o filtrado a ser utilizado como controle (EC) na Etapa 2. Este cultivo consistiu no inóculo algal em meio WC pH 7,0, acrescido de 10 mL do meio de cultivo onde estavam os cladóceros (MCZ + cladóceros). Desta forma, o cultivo continha outros microrganismos (bactérias, fungos e vírus) que na condição 1 acompanharam o inóculo do cladóceros. Essa condição utilizada como controle, evita que possíveis alterações detectadas no “tratamento” com EZ pela presença dos microrganismos, sejam atribuídas ao cladóceros.

Ambos os tratamentos (EZ e EC) foram mantidos, durante 2 dias, na *Incubadora B.O.D 411D* (Nova Ética, Brasil), com iluminação de 150 μmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, provenientes de luz fluorescente e fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura de 20 ± 2°C.

## Etapa 2

A Etapa 2 consistiu no experimento proposto, ou seja, verificar o efeito do excretado da predação de *D. magna* sobre a morfologia das microalgas. Para realização da Etapa 2, o excretado obtido em cada condição para cada cepa de microalga passou por filtração sequencial em filtros estéreis de 2,7  $\mu\text{m}$  e 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (de fibra de vidro e acetato de celulose, respectivamente), para esterilização e obtenção do excretado dissolvido no meio após o período de predação (Figura 1, dia 10).

Nesta etapa, os cultivos de microalgas foram preparados como descrito na secção “Biomassa algal para cultivos experimentais” e as células recuperadas por centrifugação. As células de microalgas foram, então, inoculadas em frascos plásticos estéreis de 80 mL, contendo 48 mL de meio WC estéril e 12 mL (20%) do excretado obtido na Etapa 1 (Figura 1, dia 10). A concentração inicial de células algais em cada tratamento foi de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Nesta Etapa, cada uma das 8 cepas de microalgas foi cultivada, em trélicas, com cada um dos 2 excretados obtidos na Etapa 1 (ou seja, EZ e EC das respectivas cepas). Deste ponto em diante (Etapa 2), utilizaremos o termo “Tratamento” (TZ) para os cultivos com EZ e o termo “Controle” (C) para os cultivos com EC.

Todos os frascos foram incubados (Incubadora Informs HT Multitron, Suíça) sem rotação e com luz LED adaptada (4000 k) com iluminação de 150  $\mu\text{mol}$  fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante cinco dias. As amostragens para análises morfológicas e citométricas foram realizadas nos seguintes tempos: T1 (4h), T2 (48h), e T3 (120h). As amostragens foram realizadas em condições estéreis após homogeneização.

Para as análises ao microscópio ótico, as amostras foram fixadas com 4% (concentração final) de formaldeído e armazenadas na geladeira a 4°C. Para as análises no citômetro, as amostras foram fixadas com 1 % (concentração final) de formaldeído e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

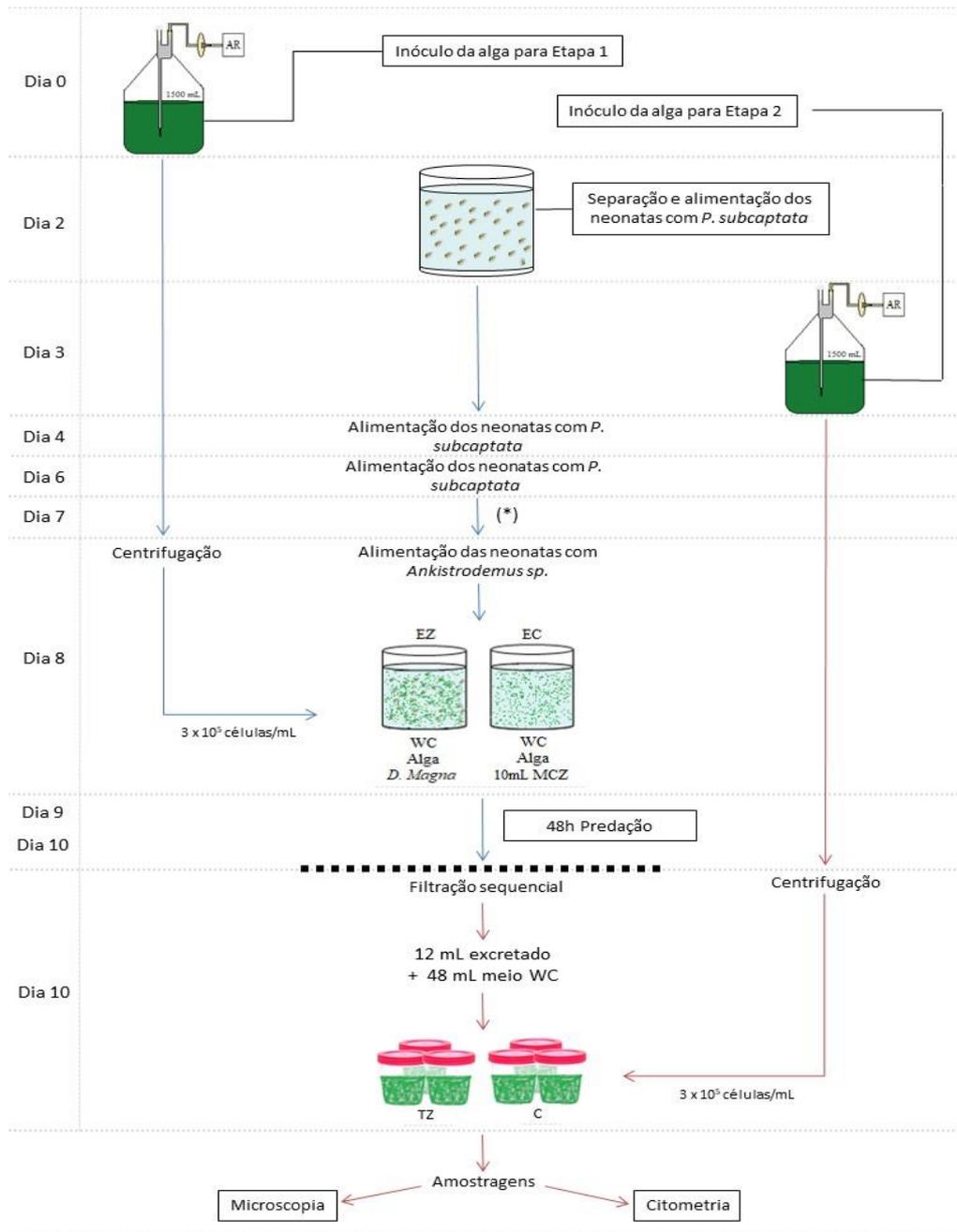


Figura 1. Esquema do delineamento experimental para cada cepa de microalga verde do gênero *Ankistrodesmus* estudada. As linhas azuis representam a Etapa 1, enquanto as linhas vermelhas representam a Etapa 2. Na Etapa 1, dois tipos de culturas foram preparados para obter os excretados da predação pelo predador: Excretado do Zooplâncton (EZ), com a adição de 15 indivíduos de *Daphnia magna*, e Controle do Excretado (EC), com a adição de 2% (\* ) do meio de cultura onde os cladóceros foram cultivados (portanto, incluía outros microrganismos). Para a Etapa 2 (após a filtração sequencial), duas outras culturas foram preparadas para avaliar a plasticidade fenotípica em cepas de algas a partir do excretado obtido na etapa anterior: Tratamento (TZ) e Controle (C). Ao todo, foram realizadas três amostragens para análise em microscopia e citometria: primeiras horas de cultivo (T1), 48h (T2) e 120h (T3). As culturas na Etapa 2 foram realizadas em triplicatas.

#### 4.5 Microscopia, Citometria e Análises Estatísticas

As análises morfológicas foram feitas usando o microscópio ótico *Zeiss Axioplan 2* (Jena, Alemanha) e as imagens foram obtidas com uma câmera *Zeiss AxioCam HRc* utilizando software *Axiovision 4.5* (Zeiss, Alemanha). Para cada réplica de cada cepa, foram registrados, no mínimo, 30 células em cada uma das 3 amostragens realizadas: T1, T2 e T3. Foram medidos o comprimento e a largura celular (Figura 2). O comprimento total foi medido seguindo a curvatura celular.

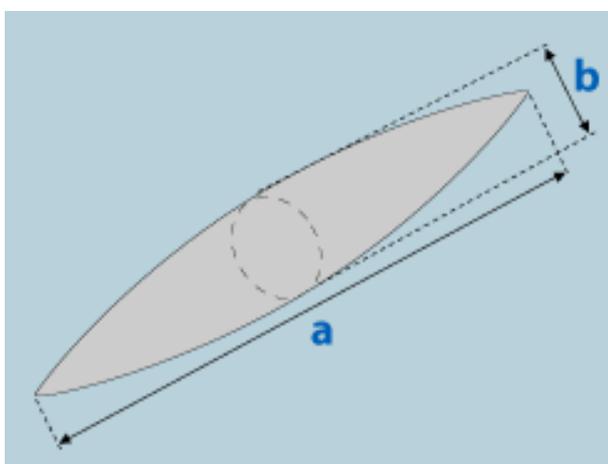


Figura 2. Esquema das medidas de comprimento (a) e a largura (b) das células de *Ankistrodesmus*. Nas células curvas, a medida de comprimento foi realizada seguindo a curvatura celular (Fonte: [www.planktonforum.eu](http://www.planktonforum.eu)).

As análises citométricas foram realizadas em citômetro de fluxo *FACSalibur™* (Becton Dickinson, USA), modelo 2111D-015SLBD com laser de 488 nm de emissão. As leituras foram feitas no software *BD Cell Quest™ Pro*. As células algais foram delimitadas utilizando o canal FL3-H para sinais de fluorescência da clorofila *a* e dispersão lateral no canal Side Scatter (SSC-H), para a obtenção da densidade de indivíduos em cada cultivo experimental. A dispersão frontal no canal Forward Scatter (FSC-H) foi utilizada como estimativa de tamanho do indivíduo (COLLIER, 2000), embora para formas muito mais longas que largas, o parâmetro tenha baixa correlação com volume celular (OLSON; ZETTLER; ANDERSON, 1989). Assim, consideramos o parâmetro FSC-H como estimativa indireta de formação de colônia ou agregados (tamanho

do indivíduo), embora o tamanho celular (em unicelulares) também possa interferir nos resultados desse parâmetro. As análises foram feitas no programa *FlowJo v.10.07* e forneceram valores de densidade de indivíduos e de tamanho celular (FSC-H).

Os valores de cada variável medida, ou seja, de comprimento e largura celular obtidos por microscopia, assim como a densidade e tamanho de indivíduos obtidos por citometria, foram comparados entre os diferentes tempos de cultivo e tratamentos (TZ e C) por meio do *Teste t de Student* realizado no *software R* (R CORE TEAM, 2017). O valor de significância adotado foi de  $\alpha < 0,05$ . Os boxplots foram gerados utilizando o *software R* (R CORE TEAM, 2017).

## 5 Resultados

### 5.1 Comprimento e largura celular obtidos por microscopia

Os resultados de tamanho celular obtidos por microscopia mostraram que em todas as cepas do gênero *Ankistrodemus* sob influência dos cairomônios excretados pela *Daphnia magna* houve plasticidade fenotípica, com alteração significativa em ao menos um dos parâmetros utilizados (comprimento e largura) em pelo menos um dos tempos analisados (Figura 3 e Figura 4, respectivamente).

Única representante da espécie *Ankistrodemus arcuatus*, a cepa CCMA-UFSCar 024 apresentou alteração significativa no comprimento no T2 (Figura 3). Nesse tempo, o comprimento das células do tratamento estava 5,52% maior em relação ao controle (Figura 5). Já a largura celular foi significativamente maior no tratamento em todos os dias avaliados (Figura 4), com aumento médio de em T1, T2 e T3 de 4,6%, 7,79% e 7,44%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 6).

A espécie *Ankistrodemus densus* foi representada por 3 cepas: CCMA-UFSCar 003, CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239. Todas as cepas tiveram aumento significativo de comprimento celular no T2 quando comparadas ao controle, mas apenas na cepa CCMA-UFSCar 003 essas alterações permaneceram até o T3 (Figura 3 e Figura 7). Nesta cepa, houve aumento do

comprimento celular no tratamento de 3,84% e 6,15%, em T2 e T3, respectivamente (Figura 5). No T2 as cepas CCMA-UFSCar 128 e CCMA-UFSCar 239 apresentaram aumento no comprimento celular de 4,95% e 5,44%, respectivamente, com a presença do excretado do cladóceros (Figura 5).

Entretanto, para largura, as medidas variaram entre as cepas de *A. densus*. Para a CCMA-UFSCar 003, a resposta significativa aos infoquímicos dos predadores foi detectada em todos os tempos (Figura 4). Entretanto, a diferença na largura celular entre tratamento e controle reduziu ao longo do tempo (15,12% em T1; 9,68% em T2 e 7,44% em T3) (Figura 6). Para a cepa CCMA-UFSCar 128, a diferença significativa na largura foi observada apenas no segundo dia analisado (T2) (Figura 4), no qual as células do tratamento se encontravam 8,39% mais largas que as células do controle (Figura 6). Por fim, a CCMA-UFSCar 239 apresentou respostas significativas logo nas primeiras horas (T1), com 9,77% de aumento médio da largura no tratamento, e se estendendo até T2, diferença de 11,15% na largura média entre tratamento e controle (Figura 4 e 6).

A espécie *Ankistrodesmus fusiformis* foi representada pelas cepas CCMA-UFSCar 605 e CB 2009/30. Não foram observadas diferenças significativas no comprimento da CCMA-UFSCar 605 (Figura 3). No entanto, a cepa CB 2009/30 apresentou aumento significativo (em média 13,15%; Figura 5) no comprimento das células do tratamento em T2 (Figura 3). É válido ressaltar que essa foi a maior diferença observada para comprimento entre as cepas analisadas. Para largura, ambas as cepas apresentaram aumento significativo no tratamento, mas apenas no último dia analisado (T3). Assim, em T3, para a cepa CCMA-UFSCar 605 a largura celular foi em média 7,47% maior no tratamento, enquanto que para CB 2009/30 o aumento foi de aproximadamente 6% do tratamento em relação ao controle.

Por fim, a espécie *Ankistrodesmus stipitatus*, apresentou respostas ligeiramente diferentes entre as duas cepas utilizadas: CCMA-UFSCar 176 e CCMA-UFSCar 277. Para o comprimento, a cepa CCMA-UFSCar 176 apresentou diferença significativa apenas no T2 (Figura 3), com uma pequena variação entre tratamento e controle (2,05% maior no tratamento) (Figura 5). A

cepa CCMA-UFSCar 277 apresentou resposta significativa um pouco mais tardia, com pequeno aumento (3,06 %; Figura 5) no comprimento médio do tratamento apenas no último dia de análise (Figura 3). Para a largura celular, houve aumento significativo na maioria dos tempos de contato como excretado do predador em ambas as cepas, exceto nas primeiras horas analisadas (T1) da cepa CCMA-UFSCar 277 (Figura 4). Para a cepa CCMA-UFSCar 176 os aumentos médios da largura do tratamento em relação ao controle foram de: 9,36% em T1, 10,09% em T2 e 7,23% em T3 (Figura 6 e Figura 8). Para a cepa CCMA-UFSCar 277, em T2, as células do tratamento estavam 4,49% mais largas que as células do controle, e essa diferença aumentou em T3, chegando a 7,72% (Figura 6).

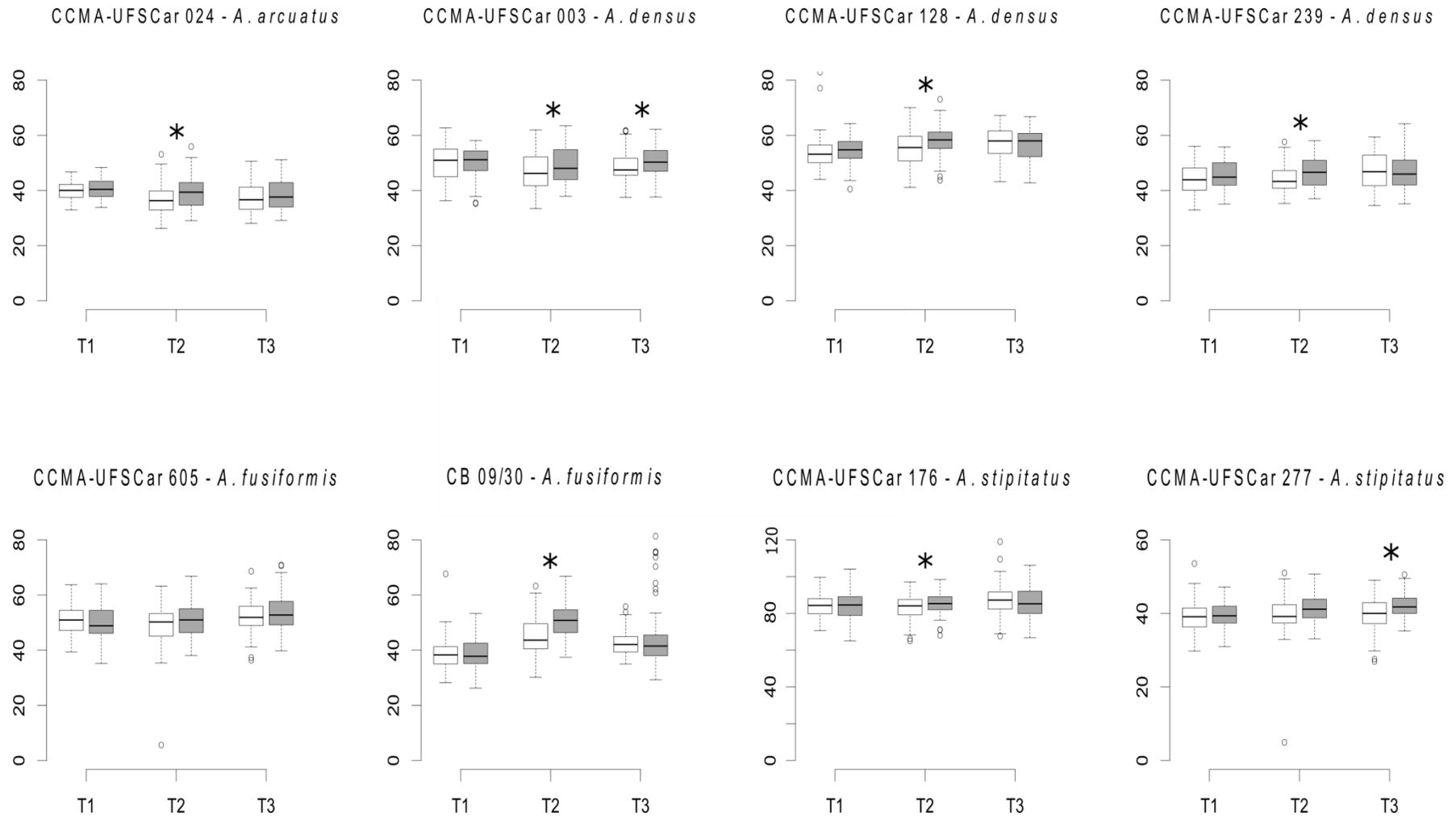


Figura 3. Variação no comprimento celular (µm) das cepas de *Ankistrodesmus* no controle (branco) e no tratamento com adição de inofocímicos dos cladóceros (cinza) em três tempos de cultivo. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h). Diferenças significativas (p < 0,05) entre tratamento e controle são indicadas pelo asterisco (\*). Para cada tempo amostral n = 90 células (30 por réplica).

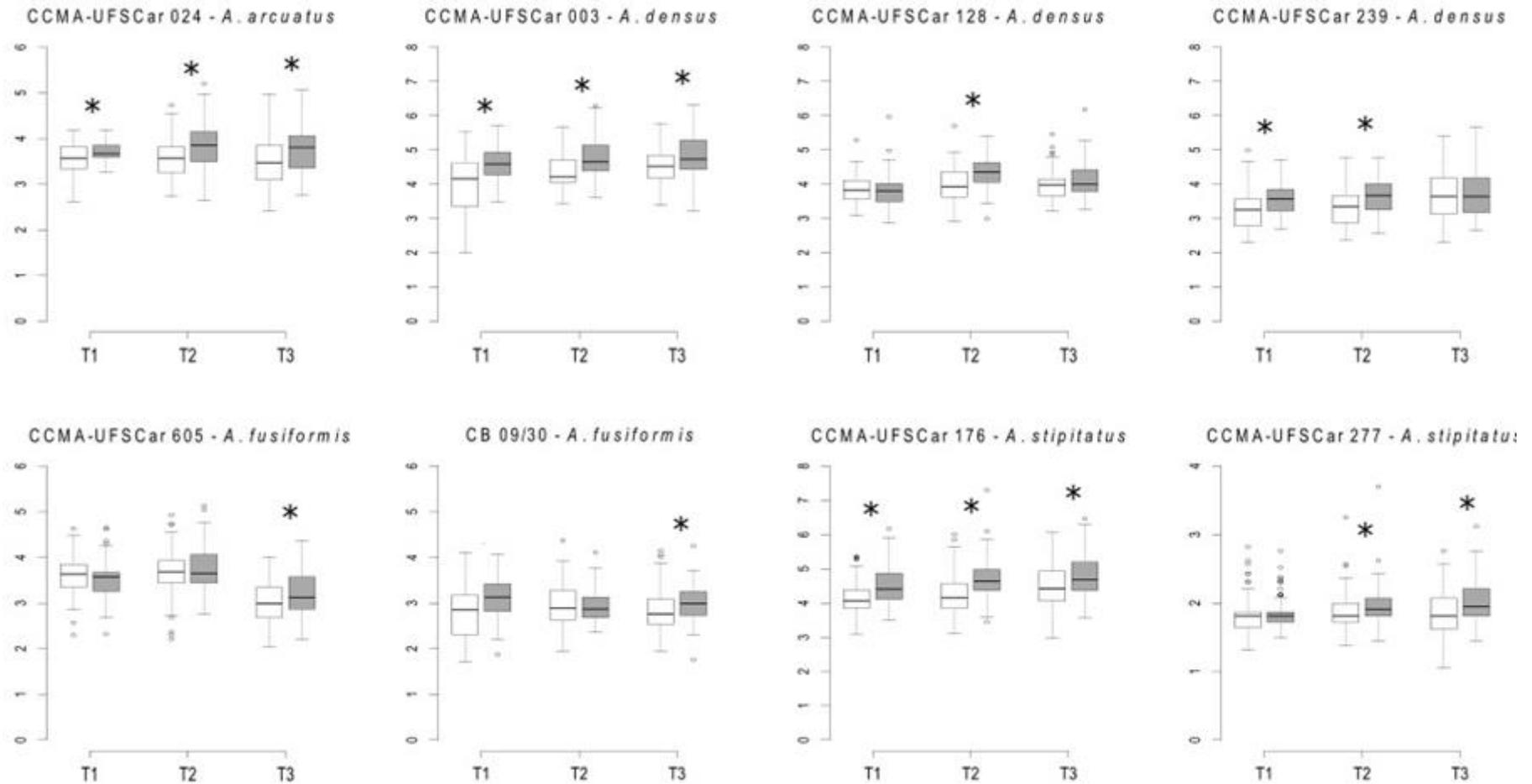


Figura 4. Variação na largura celular ( $\mu\text{m}$ ) das cepas de *Ankistrodesmus* no controle (branco) e no tratamento com adição de infoquímicos dos cladóceros (cinza) em três tempos de cultivo. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamento e controle são indicadas pelo asterisco (\*). Para cada tempo amostral  $n = 90$  células (30 por réplica).

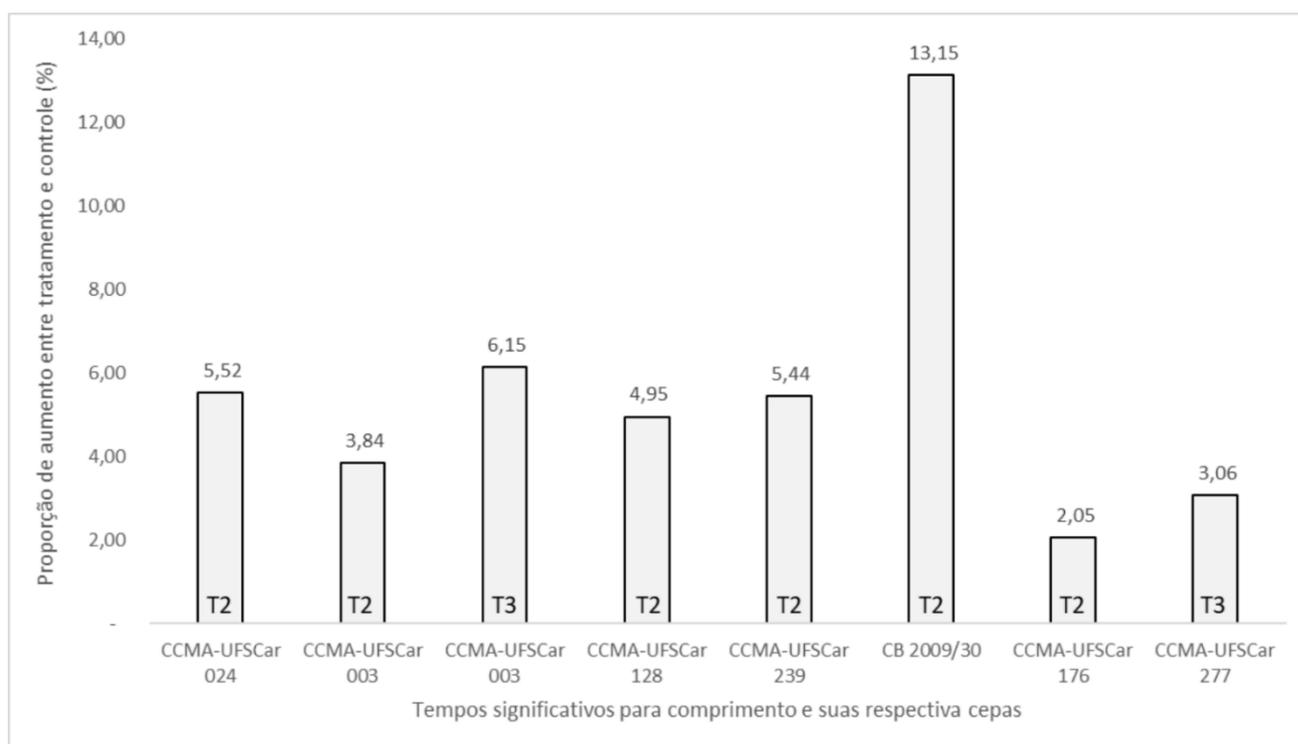


Figura 5. Proporção de aumento do comprimento celular (%) das cepas de *Anikistrodesmus* do tratamento em relação ao controle nos tempos em que é essa diferença foi significativa (ver Figura 3) para cada cepa. T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h).

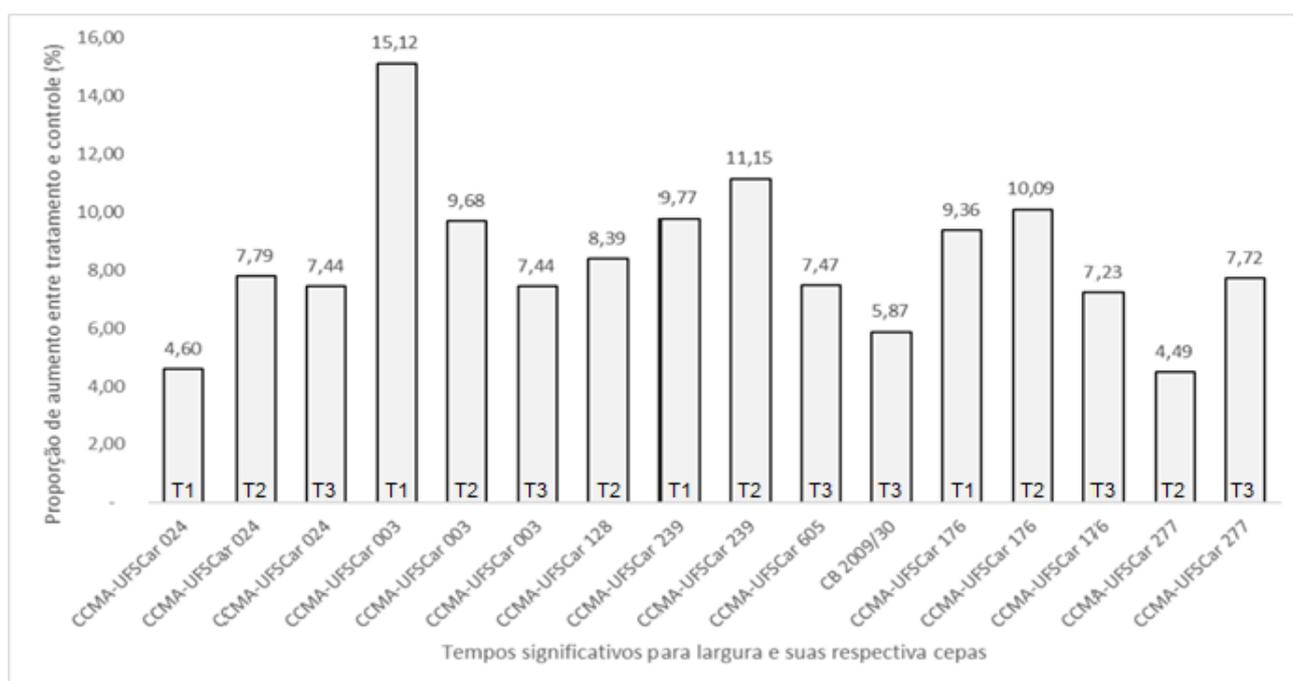


Figura 6. Proporção de aumento da largura celular (%) das cepas de *Anikistrodesmus* do tratamento em relação ao controle nos tempos em que é essa diferença foi significativa (ver Figura 4) para cada cepa. T1 = primeiras horas (4h); T2 = dia 2 (48h); T3 = dia 5 (120h).



Figura 7. Exemplo de variação no comprimento celular da cepa CCMA-UFSCar 003 no T2 entre controle (a) e o tratamento (b). As imagens foram obtidas com uma câmera *Zeiss AxioCam HRc* utilizando software *Axiovision 4.5* acoplada no microscópio ótico *Zeiss Axioplan*.

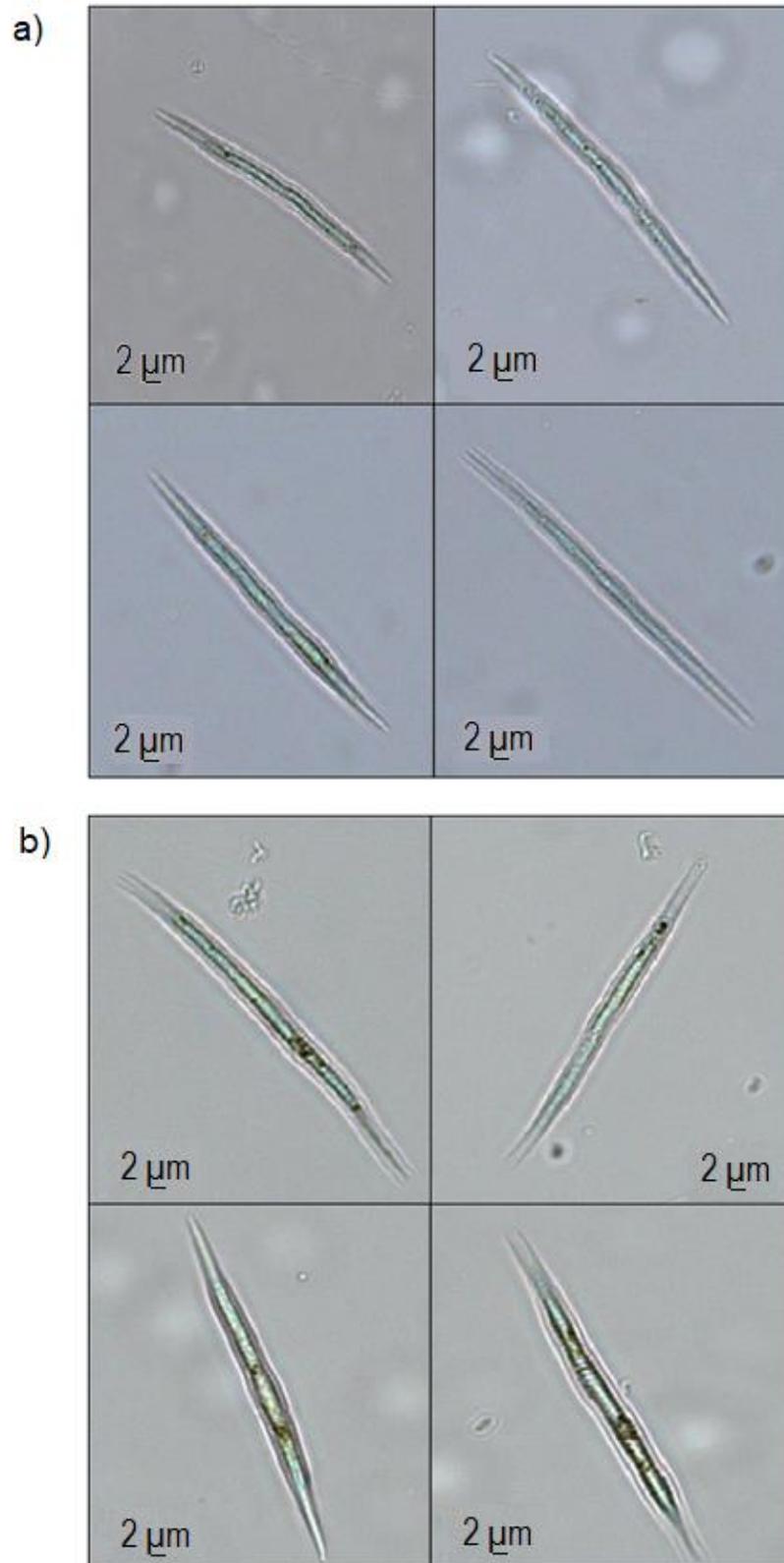


Figura 8. Exemplo de variação da largura celular da cepa CCMA-UFSCar 176 no T2 entre controle (a) e o tratamento (b). As imagens foram obtidas com uma câmera *Zeiss AxioCam HRc* utilizando software *Axiovision 4.5* acoplada no microscópio ótico *Zeiss Axioplan*.

## 5.2 Densidade e tamanho de indivíduos obtidos por citometria

Os dados citométricos forneceram valores de densidade de indivíduos (indivíduos/mL ou células + colônias/mL) e tamanho dos indivíduos (estimados pelo FSC-H). Não houve um padrão por espécie nos dados citométricos, uma vez que foram observadas diferenças significativas apenas em 3 cepas, cada uma de uma espécie (Figura 7 e 8).

As três cepas apresentaram diferenças significativas na densidade de indivíduos quando expostas aos infoquímicos dos cladóceros, a *A. arcuatus* (CCMA-UFSCar 024), uma cepa de *A. densus* (CCMA-UFSCar 239) e uma cepa de *A. fusiformis* (CCMA-UFSCar 605) (Figura 7). As 3 cepas apresentaram densidade celular no tratamento significativamente menor do que o controle, embora em tempos diferentes (Figura 7). Para a CCMA-UFSCar 024 a densidade menor no tratamento foi detectada apenas no T3, enquanto que para as outras duas, a diferença foi detectada em T2. As demais cepas não apresentaram diferenças significativas na densidade de indivíduos entre controle e tratamento em nenhum dos tempos.

Diferente dos dados da microscopia, em que foi possível detectar alguma alteração morfológica em todas as cepas, os dados de FSC-H de citometria mostraram diferença no tamanho dos indivíduos (células + colônias), ou seja, no aumento da formação de colônias, apenas para a cepa CCMA-UFSCar 605 (*A. fusiformis*) em T2 (Figura 8). Desta forma, esta cepa foi a única entre todas que apresentou diferenças em ambos os parâmetros medidos por citometria (em T2) (Figuras 7 e 8). Para as demais cepas, não encontramos diferenças significativas entre controle e tratamento no FSC.

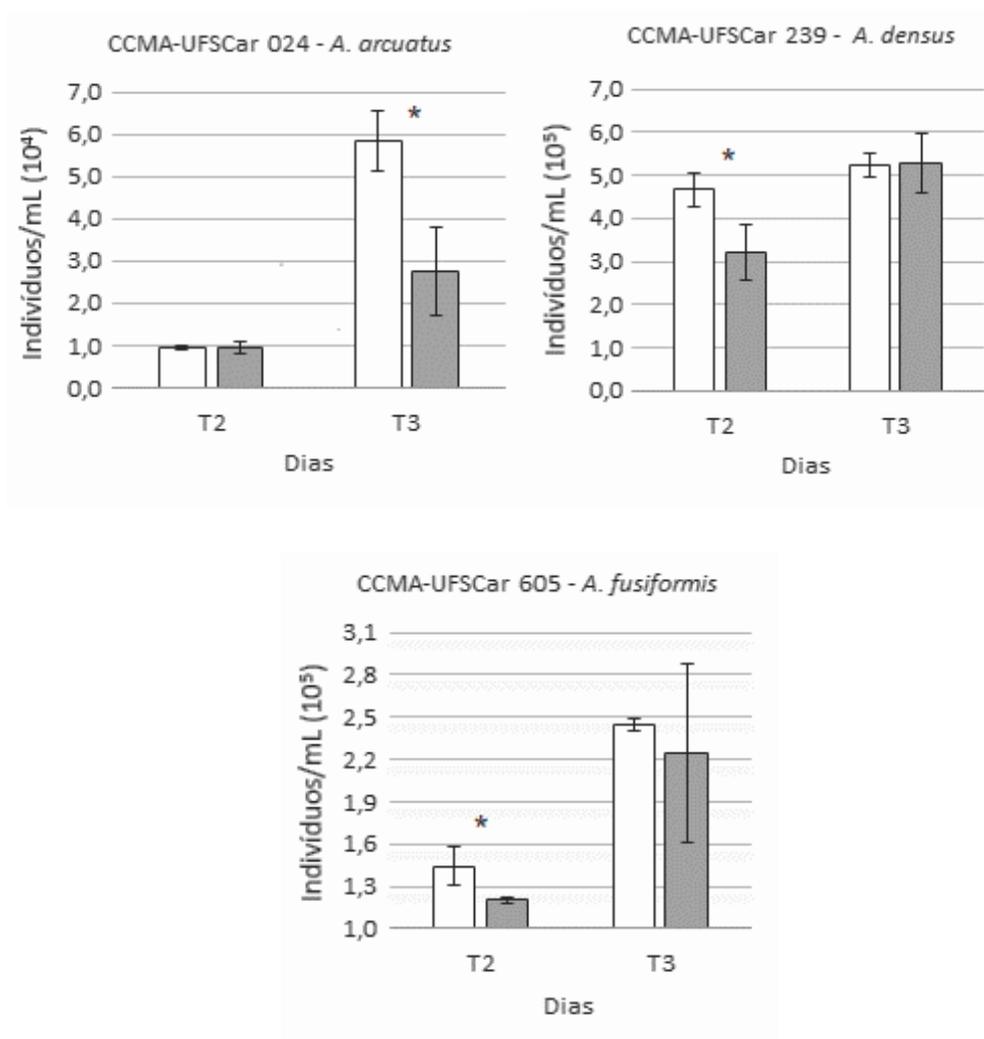


Figura 9. Densidade de indivíduos das cepas de *Ankistrodesmus* (células + colônias) que apresentaram diferença significativa entre o tratamento e o controle analisada pela citometria de fluxo nos tempos T2 e T3. Foi considerado como diferença significativa o valor de  $p < 0,05$  (\*).

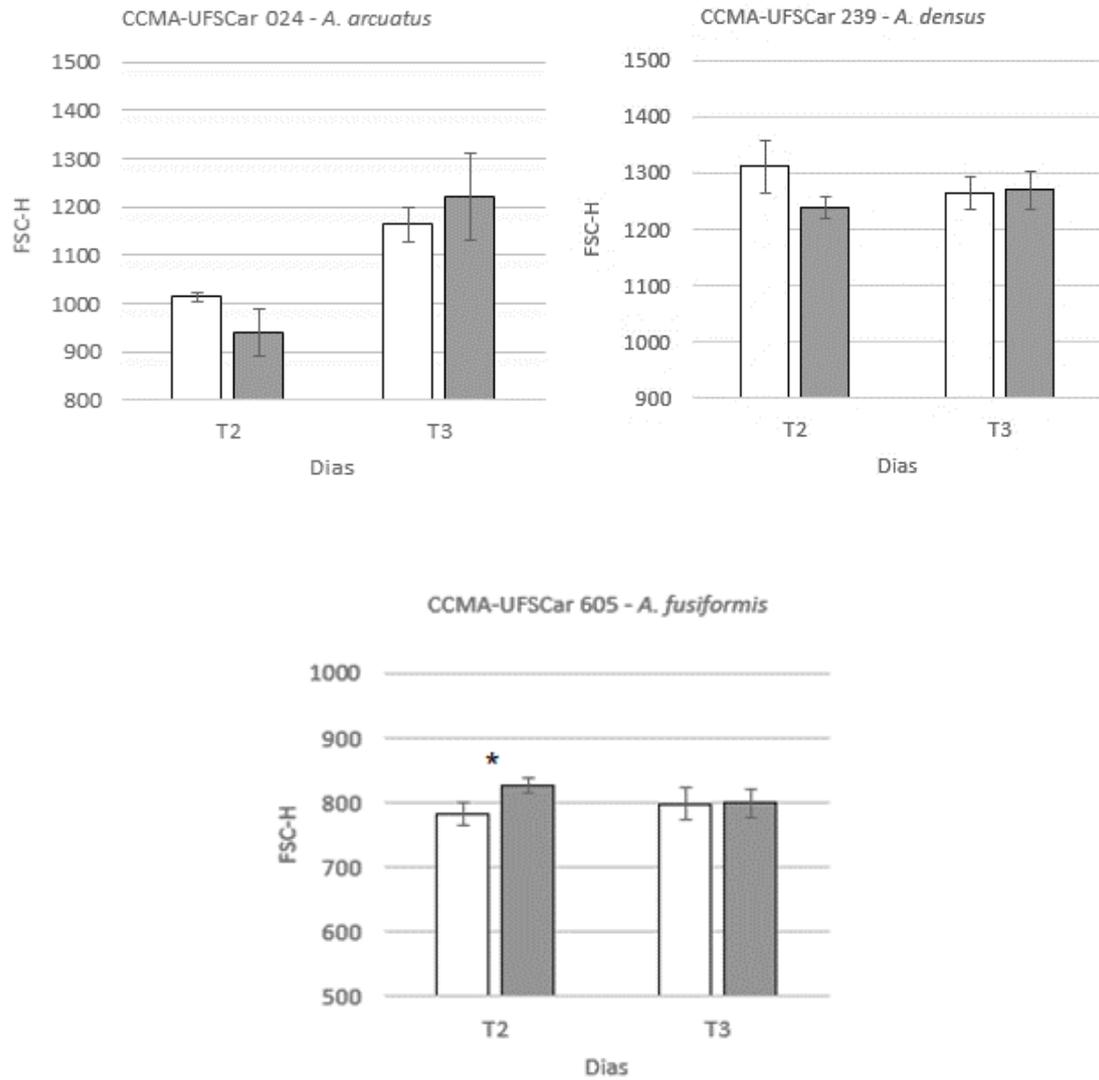


Figura 10. Tamanho celular (FSC-H) das cepas de *Ankistrodesmus* (células + colônias) que apresentaram diferença significativa entre o tratamento e o controle analisada pela citometria de fluxo nos tempos T2 e T3. Foi considerado como diferença significativa todo valor de  $p < 0,05$  (\*). Os valores de FSC-H são arbitrários.

## 6 Discussão

Neste trabalho, avaliamos a plasticidade morfológica em diferentes espécies do gênero *Ankistrodesmus* sob efeito dos produtos excretados por um predador, *Daphnia magna*. Para isso, o tamanho da célula, estimado por comprimento e largura, assim como densidade e estimativa de tamanho (FSC-H) dos indivíduos (células ou colônias) por citometria, foram avaliados. De forma geral, os cairomônios excretados por *Daphnia magna* influenciaram diretamente em pelo menos uma das medidas celulares das microalgas.

O parâmetro FSC-H foi utilizado para verificar a formação/manutenção de colônias ou agregação celular. Essa informação é importante, porque o único trabalho da literatura sobre a resposta de duas cepas de *Ankistrodesmus* (*A. falcatus* e *A. bibraianus*) à predação por microcrustáceos reporta que não foi possível detectar indução de formação de colônias nestas espécies (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999). Embora não tenhamos analisado nenhuma dessas duas espécies, nossos resultados também apontam que a indução de formação de colônias não é uma característica predominante nas espécies do gênero.

No entanto, uma única cepa (*A. fusiformis*, CCMA-UFSCar 605) apresentou FSC-H significativamente maior no tratamento do que no controle em T2, sugerindo que a manutenção/formação de colônia pode ocorrer em algumas cepas. A formação/manutenção de colônias como mecanismo defensivo induzível em algas da ordem Sphaeropleales em resposta aos infoquímicos excretados por seus predadores já foi documentada em outros trabalhos, mas grande parte dos trabalhos explora o gênero *Scenedesmus* (e.g. ELERT; FRANCK, 1999; HESSEN; VAN DONK, 1993; LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994; LÜRLING; BEEKMAN, 1999; LÜRLING; DE LANGE; VAN DONK, 1997; PLANCK; ROTHHAUPT; ELERT, 2013). Este gênero de microalgas verdes apresenta uma ampla plasticidade morfológica, seja por fatores bióticos ou abióticos (TRAINOR, 1992; TRAINOR; EGAN, 1991; VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999). Ainda assim, indução de formação de colônias em *Scenedesmus* é ampla, mas não é universal (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999), como observamos também com as espécies do gênero *Ankistrodesmus*.

A cepa CCMA-UFSCar 605 apresentou também menor densidade de indivíduos em relação ao controle quando o FSC-H foi significativamente maior no tratamento. A menor densidade poderia ser explicada pela manutenção de colônias liberadas por autospórea no tratamento, e dissolução das colônias no controle (aumentando o número de indivíduos por citometria). No entanto, outras duas cepas que não apresentaram indícios de formação de colônias, também apresentaram menor densidade de indivíduos quando expostas aos infoquímicos dos predadores: CCMA-UFSCar 024 (*A. arcuatus*) em T3 e CCMA-UFSCar 239 (*A. densus*) em T2. Uma vez que ambas as cepas tiveram comprimento e largura celulares significativamente maiores no tratamento, é possível que as células expostas aos infoquímicos do predador tenham investido energeticamente no aumento do tamanho celular em detrimento da reprodução. Neste caso, o desacoplamento do crescimento e da divisão celular explicaria o aumento do tamanho das células e a redução da densidade celular no tratamento (JAMERS; COEN, 2010).

As demais cepas analisadas apresentaram respostas em relação ao tamanho celular (microscopia), embora nenhuma alteração dos dados citométricos tenha sido detectada. Desta forma, a maioria das cepas (7 de 8) apresentou aumento significativo em ambos os parâmetros, comprimento e largura, em pelo menos um dos tempos quando exposta ao excretado de *D. magna*. Entretanto, as respostas foram variáveis mesmo para cepas da mesma espécie.

Para largura, todas as cepas apresentaram aumentos significativos em pelo menos um dos tempos analisados. Para o comprimento celular, 7 das 8 cepas do gênero *Ankistrodesmus* apresentaram alteração significativa em pelo menos um dos dias analisados, com exceção da cepa CCMA-UFSCar 605 (*A. fusiformis*). Curiosamente, esta foi a cepa que apresentou FSC-H, que sugere formação de colônias, significativamente maior no tratamento. Isso pode indicar que *Ankistrodesmus* pode apresentar estratégias diferentes para evitar a predação: formação de colônias ou aumento de tamanho celular, sendo a última estratégia predominante.

De forma geral, os resultados sugerem que as células são induzidas a um aumento de comprimento e largura celular em poucos dias quando expostas a água filtrada dos predadores, mesmo que para comprimento as variações não se estenderam até T3, diferentemente dos dados de largura. Esses resultados são novos para a literatura, pois embora um trabalho tenha analisado a indução na formação de colônias (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999), não há relatos de análise de variação no tamanho celular para *Ankistrodesmus* ou para outros gêneros de microalgas da família Selenastraceae quando são expostas aos efeitos dos cairomônios resultantes da predação.

Analisando em nível de espécie, foi possível detectar um padrão de comportamento para comprimento apenas em *Ankistrodesmus densus*, já que todas tiveram resposta para comprimento e largura ao menos em T2. Para largura, os padrões de resposta foram bem variáveis para cepas da mesma espécie, com exceção da *Ankistrodesmus fusiformis*, já que as duas cepas apresentaram respostas apenas no último tempo analisado (T3). No entanto, de forma geral, observamos que cepas da mesma espécie, apresentaram respostas em tempos variáveis, mostrando que há variação intraespecífica na resposta. Isso sugere que a resistência à herbivoria também pode variar entre diferentes cepas da mesma espécie de algas (VAN DONK, 1997; VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999).

Para comprimento, a cepa CCMA-UFSCar 277 apresentou resposta mais tardia que as demais (T3) e a maioria das cepas apresentou resposta no T2. Para largura, metade das cepas (CCMA-UFSCar 024, CCMA-UFSCar 003, CCMA-UFSCar 239 e CCMA-UFSCar 176) apresentou respostas logo nas primeiras horas de experimento (T1), se estendendo até T3, com exceção da cepa CCMA-UFSCar 239, que se manteve até T2. Apesar das variações, 6 de 8 cepas apresentaram largura significativamente maior no tratamento em relação ao controle em T2. Apenas as cepas CCMA-UFSCar 605 e CB 2009/30 apresentaram respostas significativas para a largura tardiamente (T3). O desenvolvimento de repostas induzidas até dois dias de exposição das células algais aos produtos químicos excretados pelos predadores já foi documentado em outros trabalhos (LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994; LÜRLING; VAN DONK, 1997).

LAMPERT et al. (1994) sugeriu que, possivelmente, as respostas se tornem variáveis e menos detectáveis ao longo do tempo devido a redução do efeito do excretado sobre as células algais. Assim, a concentração reduzida dos produtos químicos indutores e o aumento de tamanho da população dos cultivos podem resultar em uma menor exposição das células a esses produtos químicos (LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994), o que levaria à redução das diferenças entre o tratamento e o controle, por exemplo. Essa inativação pode ser causada pela adsorção e incorporação dos químicos indutores nas células de algas (LURLING; VAN DONK, 2000). Embora a degradação bacteriana também possa limitar a persistência dos infoquímicos no meio, em nosso experimento, os excretados foram filtrados em 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilização e os cultivos algais estavam axênicos. A resposta em até 48h de exposição foi bastante evidente para o comprimento celular, no entanto, nossos resultados sugerem que a largura celular pode apresentar uma resposta mais rápida aos infoquímicos, além de ser mais sensível à diminuição de concentração, já que mais da metade das cepas ainda apresentava largura maior no tratamento com 120 h de exposição.

Além disso, quando comparamos os dois parâmetros da microscopia, foi possível observar que a largura das células aumentou em uma proporção muito maior do que a do comprimento celular. Sabe-se que existe uma relação direta entre o tamanho do corpo do predador e o tamanho máximo da célula que ele pode ingerir (BURNS, 1968), sendo que *D. magna* pode ingerir partículas de 0,6 a 40  $\mu\text{m}$  (GELLER; MULLER, 1981). Como o comprimento da maioria das células de *Ankistrodesmus* geralmente ultrapassa esse limite para a predação de *Daphnia magna*, possivelmente a ingestão da presa ocorre de forma que a célula passe pelo aparelho de filtração do predador orientada pela sua menor dimensão celular (neste caso, a largura). Desta forma, o aumento mais acentuado da largura celular poderia ser uma resposta defensiva induzida também importante para dificultar a predação.

É importante ressaltar que a resistência à predação envolve custos metabólicos (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999). Portanto, as microalgas direcionam um gasto energético para criar mecanismos defensivos morfológicos que possam reduzir sua taxa de mortalidade. Caso isso não aconteça, haverá

uma redução em sua habilidade competitiva. Portanto, existe um trade-off entre resistência ao *grazing* ou a taxa paga pelo custo metabólico (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999). Fatores como a quantidade e o tamanho do predador (VAN DONK; LÜRLING; LAMPERT, 1999), assim como a concentração dos caimônios (LAMPERT; ROTHHAUPT; VON ELERT, 1994), podem afetar diretamente as respostas induzidas em microalgas, especialmente no tamanho da partícula. Neste trabalho, mesmo com abordagem utilizando apenas os infoquímicos liberados pelo predador e em diluição de 20%, as microalgas do gênero *Ankistrodesmus* apresentaram respostas plásticas, investindo principalmente em aumento do tamanho celular, sem prejuízo para o número de indivíduos, na maioria dos casos.

Além da importância para o entendimento da interação predador-presa, ainda pouco conhecido para cladóceros-*Ankistrodesmus*, os resultados aqui apresentados são importantes também para a taxonomia das espécies estudadas. A identificação com base morfológica faz parte da sistemática tradicional da família Selenastraceae e o comprimento e a largura são características usadas para a taxonomia (GARCIA et al., 2017). Os resultados mostram que a predação pode aumentar em mais de 13 % o comprimento e mais de 15% a largura celular, e essa variação pode ser importante para melhor delimitação dos valores de comprimento e largura das espécies. O efeito da predação na morfologia das algas pode também dificultar a identificação dos organismos em seu ambiente natural.

## 7 Conclusão

A presença dos infoquímicos excretados durante a predação do cladóceros *Daphnia magna* foi capaz de induzir respostas morfológicas em cepas de diferentes espécies do gênero *Ankistrodesmus*. Apesar das diferenças em relação ao tempo, intensidade de resposta e tipo de alteração induzida, todas as cepas do gênero *Ankistrodesmus* estudadas apresentaram algum tipo de plasticidade fenotípica na presença do predador.

A principal plasticidade morfológica induzida por predação em *Ankistrodesmus* é a alteração do tamanho celular (comprimento e/ou largura). Apesar de todas as cepas terem apresentado aumento no tamanho celular (em comprimento e/ou largura) em pelo menos um dos tempos de cultivo, não foi possível observar padrão claro para cepas de uma mesma espécie.

Embora a indução de formação/manutenção de colônias tenha sido rara, os dados citométricos sugerem que esse tipo de plasticidade também pode ocorrer em cepas do gênero *Ankistrodesmus* quando expostas ao predador.

O parâmetro com resposta mais rápida e persistente foi a largura celular. Além disso, a largura aumentou em uma proporção muito maior que o comprimento celular. Como as células de *Ankistrodesmus* sp. são longas e possuem comprimento maior que o limite de tamanho filtrado pelo cladóceros, nós sugerimos que o aumento na largura celular também seja uma importante resposta de *Ankistrodesmus* para evitar predação.

## Referências

- ABNT. Aquatic ecotoxicology-Acute toxicity-Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea) Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). p. 27, 2016.
- ADLER, F. R.; DREW HARVELL, C. Inducible defenses, phenotypic variability and biotic environments. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 5, n. 12, p. 407–410, dez. 1990.
- AGRAWAL, A. A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, v. 279, n. 5354, p. 1201–1202, 1998.
- ASTM (American Society for Testing, Materials) Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E729–E796. 2001.
- ORBE, Rosa Angélica et al. Desarrollo del cladóceros nativo *Ceriodaphnia* sp con clorofitas (*Scenedesmus* sp y *Chlorella* sp) en condiciones de laboratorio. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 31, n. 1,

2020.

BAGATINI, I. L. et al. Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

BAIRD, D. J. et al. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. **Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology**. Lyngby Denmark, 1989. p. 144-148.

BERGKVIST, J. **Grazer-induced responses in marine phytoplankton**. 2012.

BROWN, JR., W. L.; EISNER, T.; WHIUAKER, R. H. Allomones and kairomones: Transspecific chemical messengers. **BioScience**, v. 20, n. 1, p. 21–22, 1970.

BURNS, C. W. The relationship between body size of filter-feeding cladocera and the maximum size of particle ingested. **Limnology and Oceanography**, v. 13, n. 4, p. 675–678, 1968.

COLLIER, J. L. Flow cytometry and the single cell in phycology. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 4, p. 628–644, 2000.

CYR, H.; CURTIS, J. M. 1999---He ´---Zooplankton community size structure and taxonomic composition.pdf. **Oecologia**, n. 118, p. 306–315, 1999.

DELORENZO, M. E. et al. Environmental Contamination and Toxicity and Bioconcentration Potential of the Agricultural Pesticide Endosulfan in Phytoplankton and Zooplankton. v. 181, p. 173–181, 2002.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? **Functional Ecology**, v. 2, n. 2, p. 131, 1988.

ELERT, E. VON; FRANCK, A. Colony formation in *Scenedesmus* grazer-mediated release and chemical features of the infochemical. **Journal of Plankton Research**, v. 21, n. 4, p. 789–804, 1999.

FALKOWSKI, P. G. et al. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 354–360, 2004.

GARCIA, T. D. S. et al. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): RbcL, 18s rDNA and ITS–2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

GELLER, W.; MULLER, H. International Association for Ecology The Filtration Apparatus of Cladocera: Filter Mesh-Sizes and Their Implications on Food

Selectivity Published by : Springer in cooperation with International Association for Ecology Oecologia The Filtration Apparatus. **Oecologia**, v. 49, n. 3, p. 316–321, 1981.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. **Yellow-Green Algae With Chlorophyllide C1,2** **Journal of Phycology**, 1972.

HARVELL, C.D., TOLLRIAN, R. (Ed.). **The Ecology and Evolution of Inducible Defenses**. [s.l: s.n.]. p. 89–103, 1999.

HESSEN, D. O.; VAN DONK, E. Morphological changes in Scenedesmus induced by substances released from Daphnia. p. 12, 1993.

JAMERS, A. N.; COEN, W. D. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green algae using differential gene expression and biochemical biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 29, n. 4, p. 893-901, 2010.

KAMPE, H. et al. Direct effects of Daphnia-grazing, not infochemicals, mediate a shift towards large inedible colonies of the gelatinous green alga Sphaerocystis schroeteri. **Limnologia**, v. 37, n. 2, p. 137–145, 2007.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295–326, 2012.

LACEROT, G. et al. The role of subtropical zooplankton as grazers of phytoplankton under different predation levels. **Freshwater Biology**, v. 58, n. 3, p. 494–503, 2013.

LAMPERT, W. Daphnia: Model herbivore, predator and prey. **Polish Journal of Ecology**, 2006.

LAMPERT, W.; ROTHHAUPT, K. O.; VON ELERT, E. Chemical induction of colony formation in a green alga (Scenedesmus acutus) by grazers (Daphnia). **Limnology and Oceanography**, v. 39, n. 7, p. 1543–1550, 1994.

LASS S.; SPAAK P. Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 221–239, 2003.

LITCHMAN, E.; KLAUSMEIER, C. A. Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, n. 1, p. 615–639, 2008.

- LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 39, n. 2, p. 85–101, 2003.
- LÜRLING, M.; BEEKMAN, W. Grazer-induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales; Chlorophyceae): coenobium and spine formation. **Phycologia**, v. 38, n. 5, p. 368–376, 1999.
- LÜRLING, M.; DE LANGE, H. J.; VAN DONK, E. Changes in food quality of the green alga *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infochemicals: biochemical composition and morphology. **Freshwater Biology**, v. 3, p. 619–628, 1997.
- LURLING, M.; VAN DONK, E. Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus*: are there costs to being colonial? **Oikos**, v. 88, p. 111–118, 2000.
- LÜRLING, M.; VAN DONK, E. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by infochemicals released in situ from zooplankton grazers. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 4, p. 783–788, 1997.
- MÜLLER, V. H. Wachstum and Phosphatbedarf von *Nitzhia actinatroides* (Lemm.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung. **Arch. Hydrobiol.(Suppl.)**, p. 399-484, 1972.
- OLSON, R. J.; ZETTLER, E. R.; ANDERSON, O. K. Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 10, n. 5, p. 636–643, 1989.
- PAU, Conxi et al. Filtering capacity of *Daphnia magna* on sludge particles in treated wastewater. **Water research**, v. 47, n. 1, p. 181-186, 2013.
- PLANCK, M.; ROTHHAUPT, K. O.; ELERT, E. VON. Chemical induction of colony in a green formation alga ( *Scenedesmus acutus* ) by grazers ( *Daphnia* ). **Limnology and Oceanography**, v. 39, n. 7, p. 1543–1550, 2013.
- RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. **Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment. Taylor and Francis Publishers, North Palm Beach, Florida, USA**, p. 3-67, 1995.
- TEAM, R. C. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, 2017.
- TOLLRIAN, R.; DODSON, S. I. Inducible defenses in Cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. **The ecology and evolution of**

**inducible defenses**, v. 177, p. 202, 1999.

TOLLRIAN, R.; HARVELL, C. D. **The ecology and evolution of inducible defenses**. Princeton University Press: Princeton University Press, 1999.

TRAINOR, F. R. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): an ordered sequence of ecomorph development<sup>1</sup>, 1992.

TRAINOR, F. R.; EGAN, P. F. Discovering the various ecomorphs of *Scenedesmus*: The end of a taxonomic era. **Archiv fur Protistenkunde**, v. 139, n. 1–4, p. 125–132, 1991.

TREVIÑO, I. F. Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España. 2008.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 2002

VAN DONK, E. Defenses in phytoplankton against grazing induced by nutrient limitation , UV-B stress and infochemicals. **Aquatic ecology**, v. 31, n. 1, p. 53–58, 1997.

VAN DONK, E. Chemical information transfer in freshwater plankton. **Ecological Informatics**, v. 2, n. 2, p. 112–120, 2007.

VAN DONK, E.; IANORA, A.; VOS, M. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: A review. **Hydrobiologia**, v. 668, n. 1, p. 3–19, 2011.

VAN DONK, E.; LÜRLING, M.; LAMPERT, W. Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits, and the impact on grazers. The ecology and evolution of inducible defenses, p. 89-103,1999.

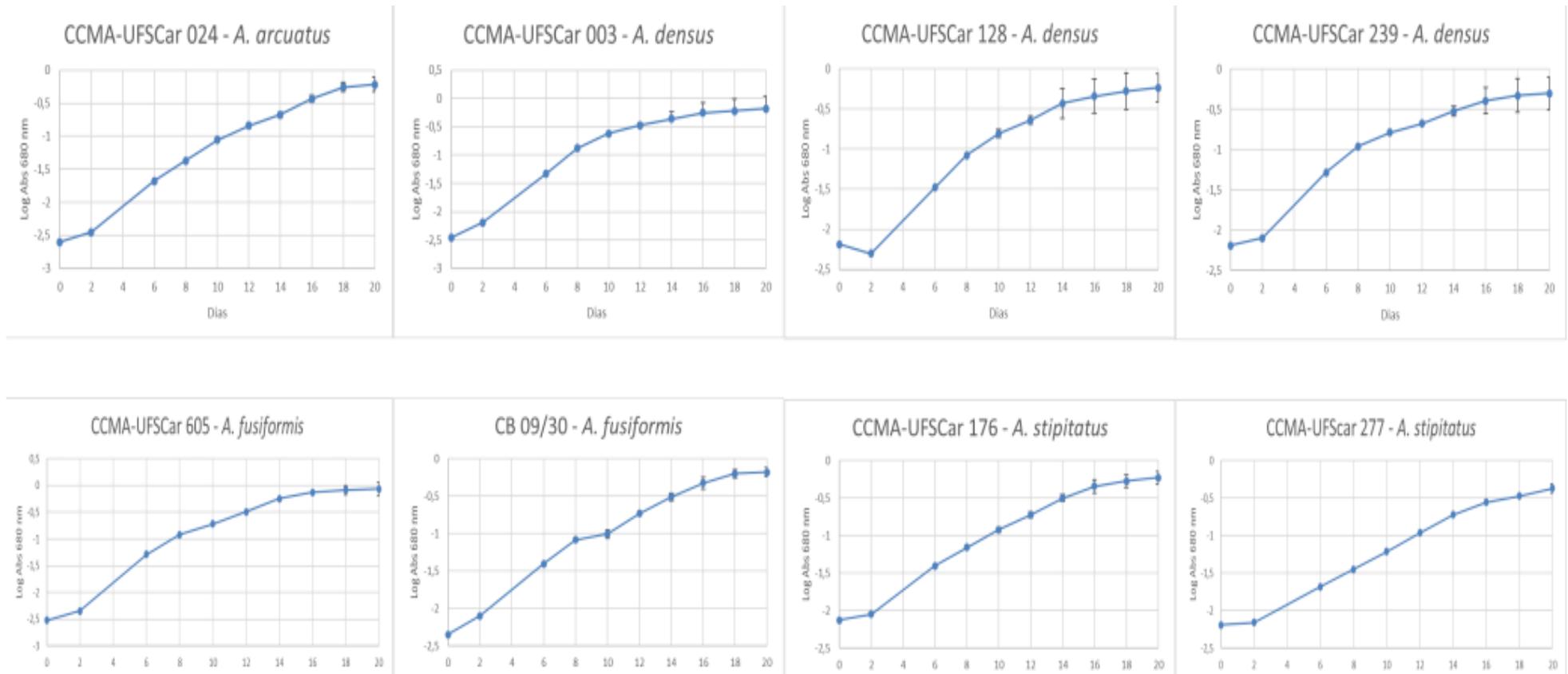
VIOLLE, C. et al. The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 4, p. 244–252, 2012.

WANG, W. L.; LIU, S. L.; CHEN, P. C. Studies on the morphotype alternation in *Monoraphidium* sp.(Selenastraceae, Chlorophyta). **Cryptogamie-Algologie**, v. 26, n. 3, p. 243–258, 2005.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249–278, 1989.

YANG, J. et al. PH-associated changes in induced colony formation and growth of *Scenedesmus obliquus*. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 187, n. 3, p. 241–246, 2016.

## Anexos



Anexo 1. Curva de crescimento em dias intercalados durante 20 dias de amostragens das microalgas testadas no trabalho. O crescimento das algas foi analisado por meio do log da absorbância da concentração de clorofila a em 680 nm.