

EFEITOS ALELOPÁTICOS DO EXTRATO DA *LEMNA MINOR* NO BIOCONTROLE DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* EM AMBIENTES EUTROFIZADOS

*Beatriz Teixeira Cayres*¹; *Ana Beatriz Laluze Vaz*^{1*}; *Adriana Cristina Poli*¹; *Karen Tavares Zambrano*¹; & *Davi Gasparini Fernandes Cunha*^{1 E}

RESUMO – A proliferação de cianobactérias em reservatórios compromete a integridade ecológica, pode causar mortalidade de organismos e inviabiliza múltiplos usos da água. Métodos físico-químicos de controle, embora amplamente utilizados, apresentam elevado custo e podem gerar efeitos colaterais indesejáveis, incluindo toxicidade a organismos não-alvo. Nesse contexto, estratégias baseadas em biocontrole têm se destacado como alternativas mais sustentáveis, com ênfase no uso de macrófitas aquáticas. Entre os mecanismos envolvidos, a alelopatia desponta como uma via potencial de supressão do crescimento de cianobactérias. No entanto, ainda são limitados os estudos que investigam o papel alelopático de espécies da família Lemnaceae. Diante disso, este estudo avaliou o efeito alelopático de *Lemna minor* (LM) sobre o crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (MA). Ensaios laboratoriais foram conduzidos com o uso de extrato de LM, evidenciando inibição significativa do crescimento da MA até o 14º dia experimental. Após esse período, observou-se recuperação do crescimento, possivelmente associada à degradação dos compostos alelopáticos ou à adaptação fisiológica da cianobactéria. Os resultados indicam que compostos derivados de LM apresentam potencial como agentes de biocontrole, embora sua eficácia dependa da persistência e estabilidade desses metabólitos no meio aquático.

Palavras-Chave – Macrófitas aquáticas; Cianobactéria; Mecanismos de inibição.

ABSTRACT– Cyanobacterial blooms in reservoirs can compromise ecological integrity, cause organism mortality, and impair multiple water uses. Although widely applied, physicochemical control methods are often costly and may induce undesirable side effects, including toxicity to non-target organisms. In this context, biocontrol-based strategies have emerged as more sustainable alternatives, particularly those involving aquatic macrophytes. Among the underlying mechanisms, allelopathy stands out as a potential pathway for suppressing cyanobacterial growth. However, studies addressing the allelopathic role of species from the Lemnaceae family remain limited. Therefore, this study evaluated the allelopathic effect of *Lemna minor* (LM) on the growth of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (MA). Laboratory assays were conducted using LM extracts, revealing significant inhibition of MA growth up to the 14th experimental day. After this period, growth recovery was observed, possibly associated with the degradation of allelopathic compounds or physiological adaptation of the cyanobacterium. These findings indicate that LM-derived compounds have potential as biocontrol agents, although their effectiveness depends on the persistence and stability of these metabolites in aquatic environments.

Key-words – Aquatic macrophytes; Cyanobacteria; Inhibition mechanisms.

1) Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carlsense, 400, 13566-590, São Carlos, São Paulo, Brasil

* ana.laluze@usp.br

1. INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado da demanda por água, aliado à intensificação da poluição, tem comprometido a qualidade dos ecossistemas aquáticos e os múltiplos usos da água. Entre as principais consequências dessas pressões, destacam-se as florações de cianobactérias, favorecidas pelo enriquecimento por nutrientes e por alterações climáticas, como o aumento da temperatura (Huisman *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2024). Essas florações representam riscos ecológicos e à saúde pública, devido à produção de cianotoxinas, como as microcistinas, associadas a efeitos hepatotóxicos e potencial carcinogênico (Ferrão-Filho; Kozłowsky-Suzuki, 2011; Hashimoto, 2024).

Microcystis aeruginosa é uma das principais cianobactérias associadas a florações tóxicas em ambientes eutrofizados, sendo amplamente reportada em mananciais impactados por altas concentrações de nutrientes e condições ambientais favoráveis ao seu crescimento (Aubriot; Bonilla, 2012; Zhu *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2024). O controle dessas florações é essencial para a proteção da saúde humana e dos ecossistemas aquáticos.

Métodos convencionais de controle, como o uso de algicidas e processos físicos, apresentam limitações relacionadas ao elevado custo, eficiência variável e potencial geração de impactos secundários, incluindo efeitos adversos sobre organismos não-alvo e a liberação de toxinas dissolvidas (Hashimoto, 2024; Kuroda *et al.*, 2009). Nesse contexto, estratégias baseadas em biocontrole têm emergido como alternativas mais sustentáveis (Li *et al.*, 2021; Maia, 2024).

Entre os mecanismos envolvidos no biocontrole, a alelopatia, caracterizada pelo uso de compostos bioativos capazes de inibir o crescimento de outros organismos, destaca-se como uma via promissora para a supressão de cianobactérias (Pinto; O'Farrell, 2006; Mohamed, 2017). Macrófitas aquáticas têm sido reconhecidas como potenciais fontes desses compostos, embora a maioria dos estudos tenha se concentrado em espécies submersas e enraizadas, com limitada atenção às macrófitas flutuantes (Jiménez, 2020).

Diante disso, este estudo avaliou o potencial alelopático de *Lemna minor* (LM) no biocontrole de *Microcystis aeruginosa* (MA), contribuindo para o avanço do conhecimento sobre mecanismos naturais de supressão de florações em ambientes eutrofizados.

2. METODOLOGIA

O potencial alelopático da macrófita aquática LM sobre o crescimento da cianobactéria MA foi avaliado por meio de ensaios laboratoriais conduzidos em microcosmos. Os experimentos foram

realizados sob condições controladas de luminosidade e temperatura, no Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP).

2.1. MEIO DE CULTIVO UTILIZADO

Para a condução dos experimentos, foi utilizado o meio de cultivo ASM-1, originalmente proposto por Gorham *et al.* (1964) e posteriormente modificado por Zagatto; Aragão (1992). Esse meio é caracterizado por apresentar uma razão molar entre nitrogênio e fósforo inorgânicos dissolvidos (NID/PID) próxima de 10:1, tendo como principais fontes o nitrato de sódio (NaNO_3) e o fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4), respectivamente.

2.2. ESPÉCIES UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a macrófita aquática *Lemna minor*, pertencente à família Lemnaceae, obtida de fornecedor autorizado. A biomassa inicial foi estabelecida de modo a garantir cobertura contínua da superfície dos recipientes, conforme recomendações da literatura (Zhao *et al.*, 2015).

A cianobactéria empregada foi *Microcystis aeruginosa*, cuja cepa foi disponibilizada pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Para os ensaios, a inoculação foi realizada durante a fase exponencial de crescimento, em volume ajustado para representar concentrações de clorofila *a* típicas de ambientes eutrofizados, de acordo com os valores de referência da Carvalho *et al.* (2013). Essas concentrações foram previamente definidas com base na curva de crescimento obtida sob as mesmas condições experimentais.

Antes do início dos experimentos, ambas as espécies foram aclimatadas em meio ASM-1, sob temperatura controlada de 24 °C, em incubadora modelo B.O.D. 411D, com fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro e intensidade luminosa de 3813 ± 389 lux.

2.3. ANÁLISE DO POTENCIAL ALELOPÁTICO

O efeito alelopático de LM sobre MA foi investigado de forma a garantir o isolamento de outros mecanismos potenciais de inibição. Para isso, o fez-se um extrato a partir de biomassa de LM previamente lavada com água deionizada e seca em estufa com circulação de ar a 40 °C até massa constante. Após secagem, o material foi triturado, pesado e submetido à extração em solução hidroalcoólica (etanol 70%), na proporção de 1:20 (m/v). O processo de extração foi conduzido em banho ultrassônico, em três ciclos consecutivos de 45 minutos a 40 °C. Ao término de cada ciclo, o

extrato foi filtrado, e o resíduo sólido foi reintroduzido no solvente para continuidade da extração. Os extratos obtidos foram posteriormente concentrados em banho-maria a 40 °C até completa evaporação do etanol e armazenados a -20 °C até sua utilização.

Foram estabelecidos três tratamentos experimentais, com cinco réplicas cada: controle (apenas MA) e dois tratamentos contendo extrato de LM nas concentrações de 0,01 e 0,1 g·L⁻¹. Os ensaios foram conduzidos a 24 °C, sob intensidade luminosa de 3813 ± 389 lux. As análises foram realizadas semanalmente, considerando os mesmos parâmetros previamente estabelecidos.

Os nutrientes foram monitorados semanalmente ao longo do período experimental (7 a 21 dias) no meio de cultivo, incluindo nitrito, nitrato, amônio e ortofosfato, com o objetivo de avaliar a dinâmica de assimilação. As análises foram realizadas conforme os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2022), com exceção do amônio, cuja determinação seguiu o método de Koroleff (1983).

O desenvolvimento de MA foi monitorado semanalmente por meio da determinação da concentração de clorofila a (corrigida para feofitina), utilizando o método de extração proposto por Nusch (1980) e posteriormente modificado por NEN (2006). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hach® 4000 V), nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm, nas unidades experimentais contendo a cianobactéria.

3. RESULTADOS

O consumo de amônio apresentou comportamento distinto entre os tratamentos, sendo significativamente maior nas unidades com extrato até o 14º dia em comparação ao controle (Figura 1). Para o nitrato, não houve diferença nesse período inicial, com aumento significativo de sua absorção apenas no 21º dia, também nas unidades tratadas. Esse padrão indica que, nas fases iniciais, MA priorizou a assimilação de amônio, devido ao seu menor custo energético em relação ao nitrato, que requer redução prévia (Ohashi *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2024), refletindo um estado de estresse metabólico. A partir do 14º dia, houve redução no consumo de amônio e aumento na assimilação de nitrato, especialmente na concentração de 0,1 g·L⁻¹, com valores significativamente superiores no 21º dia. Essa mudança sugere uma transição na resposta fisiológica da cianobactéria, indicando superação parcial do estresse inicial, possivelmente associada à adaptação aos compostos alelopáticos ou à redução de sua concentração efetiva no meio, por degradação ou diluição.

O ortofosfato não apresentou diferenças significativas de consumo entre os tratamentos até o 14º dia (Figura 1), indicando ausência de efeito inicial do extrato sobre sua assimilação por MA. Apenas no 21º dia foi observada redução em sua concentração, mais acentuada no controle, enquanto

nas unidades com extrato, especialmente a $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a absorção foi inferior, sugerindo efeito inibitório moderado. Esse padrão indica que a interferência alelopática sobre o fósforo ocorre de forma tardia e menos pronunciada em relação a outros nutrientes, possivelmente devido à maior complexidade dos processos enzimáticos envolvidos em sua assimilação. Ainda que discreto, o efeito observado evidencia a capacidade dos compostos de LM em modular a dinâmica do fósforo ao longo do tempo, contribuindo para o controle do crescimento da cianobactéria.

O nitrito apresentou acúmulo expressivo até o 14º dia, com concentrações significativamente maiores no controle em relação às unidades contendo extrato. No pico observado, os tratamentos com extrato apresentaram valores semelhantes entre si, porém inferiores ao controle, indicando influência dos compostos alelopáticos. Após esse período, houve redução gradual do nitrito em todos os tratamentos, resultando em concentrações finais sem diferenças significativas. Esse padrão sugere que o extrato favoreceu a transformação ou assimilação do NO_2^- , reduzindo sua permanência no meio nas fases iniciais. Como intermediário nas transformações do nitrogênio, sua menor acumulação nas unidades tratadas pode estar associada a alterações na atividade metabólica de MA ou no microambiente químico. Assim, embora temporário, o efeito indica a atuação de mecanismos alelopáticos capazes de modular a dinâmica do nitrogênio, especialmente nas fases iniciais de crescimento.

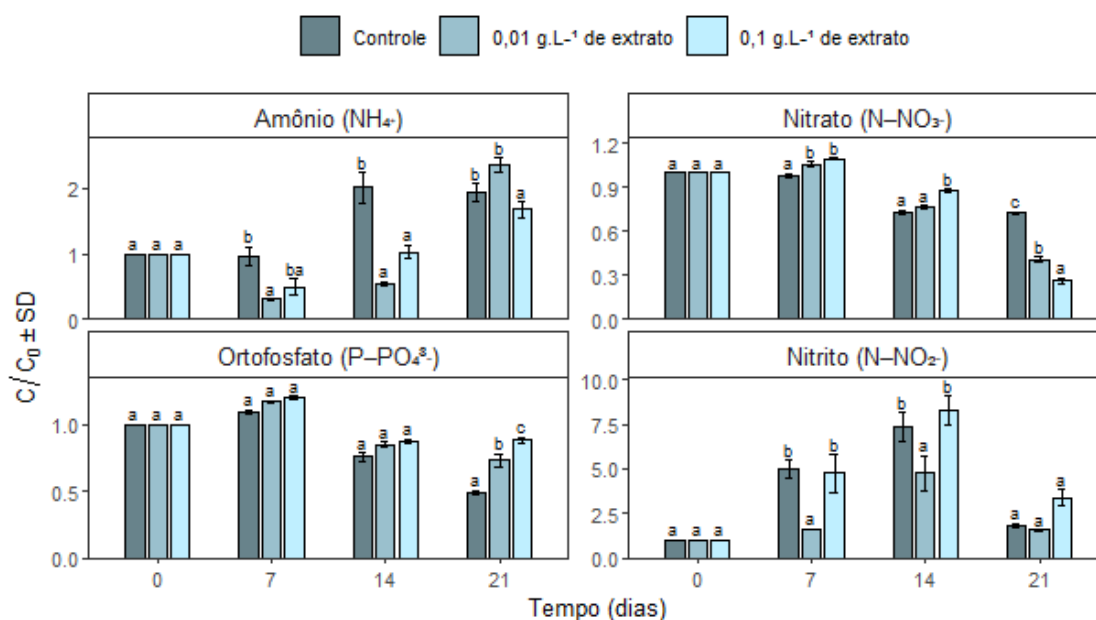


Figura 1 - Análise dos compostos inorgânicos

A concentração de clorofila *a* (Figura 2) foi significativamente menor nas unidades com extrato em comparação ao controle até o 14º dia, sem diferenças entre as concentrações, indicando efeito inibitório inicial sobre a atividade fotossintética de MA e estado de estresse fisiológico. Esse

padrão é consistente com a assimilação de nitrogênio, marcada pela predominância do consumo de amônio em relação ao nitrato. Após o 14º dia, observou-se aumento expressivo da clorofila *a*, acompanhado pela intensificação da assimilação de nitrato, indicando recuperação metabólica e restabelecimento da atividade fotossintética. Como a síntese de clorofila está diretamente associada ao crescimento, esse incremento reflete a retomada do desenvolvimento da cianobactéria. Assim, o efeito inibitório do extrato foi mais pronunciado nas fases iniciais, sendo posteriormente atenuado, possivelmente devido à adaptação fisiológica da MA ou à redução da concentração efetiva dos compostos alelopáticos por degradação ou diluição.

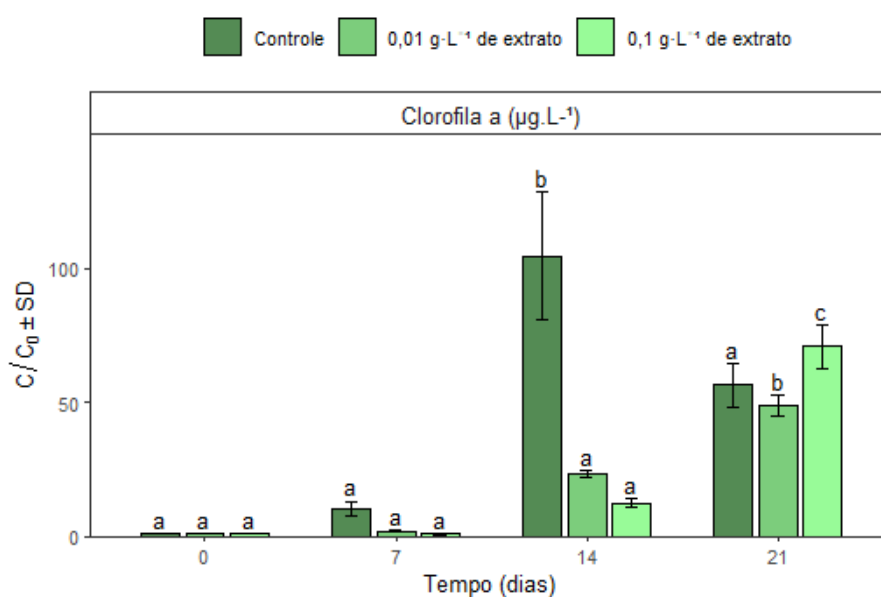


Figura 2 - Análise da concentração de clorofila *a*

Resultados semelhantes têm sido reportados na literatura para diferentes espécies de macrófitas aquáticas. Tazart *et al.* (2021) observaram que o extrato aquoso de *Myriophyllum spicatum*, especialmente na concentração de 1 g·L⁻¹, promoveu inibição do crescimento de MA nos estágios iniciais do experimento, com redução da densidade celular em relação ao controle. Entretanto, após aproximadamente dez dias de cultivo, foi registrada a retomada do crescimento, indicando redução da intensidade do efeito alelopático ao longo do tempo. De forma consistente, Lourenção (2018) também verificou efeitos inibitórios iniciais do extrato aquoso de *Pistia stratiotes* (0,5 e 1 g·L⁻¹), evidenciados pela diminuição da densidade celular e da clorofila *a* nas primeiras 72 horas. Contudo, após sete dias, observou-se redução da intensidade desse efeito, com recuperação do crescimento entre o décimo e o décimo segundo dia, sugerindo degradação ou diluição dos compostos ativos no meio.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que LM exerce efeito alelopático sobre MA, promovendo um estresse inicial caracterizado pela redução da clorofila a e pela alteração na assimilação de nutrientes. Nas fases iniciais do experimento, observou-se uma mudança no padrão metabólico da cianobactéria, com priorização de formas de nitrogênio de menor custo energético, como o amônio, indicando limitação fisiológica imposta pelos compostos presentes no extrato.

A retomada do crescimento e da assimilação de nitrato ao longo do tempo sugere que esse efeito inibitório é transitório, podendo estar associado tanto à adaptação da cianobactéria quanto à redução da concentração efetiva dos compostos alelopáticos no meio, em decorrência de processos como degradação ou diluição. Ainda assim, os resultados evidenciam que os compostos derivados de LM são capazes de modular a dinâmica de nutrientes e interferir no metabolismo da cianobactéria, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento.

Em conjunto, esses achados reforçam o potencial de LM como ferramenta de biocontrole baseada em alelopatia, com aplicação promissora em estratégias sustentáveis de manejo de florações em ecossistemas eutrofizados. Entretanto, a eficácia dessa abordagem depende da persistência e estabilidade dos compostos bioativos no ambiente, destacando a necessidade de investigações adicionais em diferentes condições e concentrações.

REFERÊNCIAS

- APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, & WEF – Water Environment Federation. (2022). “*Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*”. 22nd ed. American Public Health Association, Washington.
- AUBRIOT, L.; BONILLA, S. (2012). “*Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms*”. *Aquatic Microbial Ecology*, 67 (3), pp. 251-263. <https://doi.org/10.3354/ame01596>
- CARVALHO, M. DO C.; AGUIJARO, L. F., PIRES, D. A.; PICOLI, C. (2013). “*Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais*”. CETESB. <https://repositorio.cetesb.sp.gov.br/items/401ed4fc-d663-416b-98bf-9551d6d4e018>
- FERRÃO-FILHO, A. DA S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. (2011). “*Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals*”. *Marine Drugs*, 9 (12), pp. 2729–2772. <https://doi.org/10.3390/md9122729>
- GORHAM, P. R.; MCLACHILAN, J. R., HAMMER, V. T.; KIM, W.K. (1964) “*Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyng.) de Bréb*”. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 15, pp. 769-804.

HASHIMOTO, E. H. (2024). “Avanço metodológico no biocontrole de cianobactérias toxigênicas com ênfase a degradação de microcistina-LR e bioensaio na qualidade de água e piscicultura”. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Londrina.

HUISMAN, J.; CODD, G. A.; PAERL, H. W.; IBELINGS, B. W.; VERSPAGEN, J. M. H.; VISSER, P. M. (2018). “Cyanobacterial blooms”. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), pp. 471-483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

JIMÉNEZ, R. S. (2020). “Aquatic macrophytes, land plants and their importance in controlling cyanobacterial blooms. A documentary review”. *Ecociencia Inter. Journal*, 2(3), pp. 38-53. <https://doi.org/10.35766/je20235>

KOROLEFF, F. (1983). “Determination of ammonia-nitrogen”, in *Methods of sea water analysis*. Org. por Grasshoff, K., Ehrhardt, M. e Kremling, K., ed. Verlag chemie, Weinheim, pp. 150-157.

KURODA, E. K. et al. (2009). “Uso de microrganismos para biocontrole de cianobactérias toxigênicas e biodegradação de microcistinas” in *Anais do 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Recife – PE, 2009, pp. 1-7.

LI, B.; YIN, Y.; KANG, L.; FENG, L.; LIU, Y.; DU, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, L. (2021). “A review: Application of allelochemicals in water ecological restoration-algal inhibition”. *Chemosphere*, 267, pp. 128869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128869>

LONG, D.; LIN, G.; YAN, P.; YANG, H.; DENG, K.; GUO, J. (2024). “Characteristics of energy distribution for N, P and C sequestration by *Microcystis aeruginosa* under blue and orange light”. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(2), pp. 112054. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112054>

MAIA, P. D. S. (2024). “Interações ecológicas entre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e duas espécies de macrófitas aquáticas submersas”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Mohamed, Z. A. (2017). “Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management – A review”. *Limnologia*, 63, pp. 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.006>

NEN. (2006). “Nederlandse Norm 6520 – Water – Spectrophotometric determination of chlorophyll-a content”. Netherlands Standards.

NUSCH, E. A. (1980). “Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination”. *Archiv für Hydrobiologie (BeiheftErgebnisse der Limnologie)*, 14, pp. 14-36.

LOURENÇÃO, A. (2017). “Respostas fisiológicas de *Microcystis aeruginosa* Kützinger produtora de microcistina, exposta aos extratos de *Pistia stratiotes* L”. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.

PINTO, T. S.; O’FARREL, I. (2014). “Regime shifts between free-floating plants and phytoplankton: a review”. *Hydrobiologia*, 740, pp. 13-24. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1943-0>

TAZART, Z.; MANGANELLI, M.; SCARDALA, S.; BURATTI, F. M.; NIGRO DI GREGORIO, F.; DOUMA, M.; MOUHRI, K.; TESTAI, E.; LOUDIKI, M. (2021). “Remediation strategies to

control toxic cyanobacterial blooms: Effects of macrophyte aqueous extracts on microcystis aeruginosa (Growth, toxin production and oxidative stress response) and on bacterial ectoenzymatic activities". Microorganisms, 9(8), 1782. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081782>

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M. A. (1992). “*Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas*”. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo. Relatório Técnico. 23 p.

ZHAO, Y.; FANG, Y.; JIN, Y.; HUANG, J.; BAO, S.; FU, T.; HE, Z.; WANG, F.; WANG, M.; ZHAO, H. (2015). “*Pilot-scale comparison of four duckweed strains from different genera for potential application in nutrient recovery from wastewater and valuable biomass production*”. Plant Biology, 17(s1), 82–90. <https://doi.org/10.1111/plb.12204>

ZHU, W.; SUN, Q.; CHEN, F.; LI, M. (2015). “*Cellular N:P ratio of Microcystis as an indicator of nutrient limitation-Implications and applications*”. Environmental Earth Sciences, 74(5), 4023–4030. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4707-x>