

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOLOGIA

CONSIDERAÇÕES BIÓTICA E ABIÓTICA
SOBRE A TOXICIDADE DE *Microcystis*
***aeruginosa* KÜTZING (CIANOBACTÉRIA) NO**
ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS, RS

GILVAN TAKESHI YOGUI

Monografia apresentada à Comissão de
Curso de graduação em Oceanologia da
Fundação Universidade do Rio Grande,
como parte das exigências para a
obtenção do título de OCEANÓLOGO.

Orientador: Prof. Dr. João Sarkis Yunes

Rio Grande – RS – Brasil

fevereiro de 1999

Aos meus pais, Gilberto e
Izilda, e à minha irmã,
Gilvana

“— O oceano é minha igreja! – falei ao bruxo.

— É minha também! – disse ele se emocionando, e chorando.

Cheguei bem perto para lhe dar um abraço, quando olhei fixando nos seus olhos, e vi que na verdade, derramavam lágrimas azuis. Colhi as primeiras que escorriam do seu rosto e levei até minha boca – e foi no momento em que elas tocaram na língua com o gosto salgado igual ao da água do mar, é que descobri que dentro de cada ser humano, existe um oceano.”

do livro “O grande minerador”,
de Pedro Marodin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me dado saúde, paciência e persistência durante esses cinco anos de estudo.

Aos meus pais, Gilberto e Izilda, e à minha irmã, Gilvana, que mesmo de longe sempre estiveram muito presentes na minha vida universitária, dando-me força e exemplos de vida. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Indy (Nilamon), Felipe, Renato, Rodrigo, Guilherme, Stefan e Cristiane, Dri e Belém, Camila, Tati, Juliano, Klebinho, Daniel (argentino) e Flavio, verdadeiros amigos que foram a minha família em Rio Grande.

Ao prof. Dr. João Sarkis Yunes, meu orientador e amigo, por tudo o que me ensinou durante a iniciação científica.

Aos professores MSc. Ademilson Zamboni (Biro) e MSc. Wilson Wasielesky Jr. (Mano), que compuseram a banca examinadora do trabalho, pelas importantes críticas e sugestões.

A todo o pessoal que passou pela UPC durante esse tempo, em especial Paulo, Ana e Sandro, pelas sugestões de redação e revisão deste trabalho.

Ao CNPq e à FURG, pela concessão da bolsa de iniciação científica através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

A todos os professores que me deram aula na graduação, por tudo o que me ensinaram sobre oceanografia.

À “seleção” de 94 (não a seleção brasileira da Copa de 94, mas os “craques” que entraram no curso de Oceano em 1994), pelo bicampeonato nas Oceaníadas (96 e 97) e pelo vice-campeonato em 95 (o jogo mais emocionante da história!).

A todos os são-paulinos, palmeirenses, corinthianos, gremistas, colorados, cruzeirenses (ou seria fluminense?), flamenguistas, etc, pelas muitas brincadeiras e gozações a respeito de futebol. No fundo, todos reconhecemos que o Santos é o melhor time do mundo!!!!

Mais uma vez a Deus, por tudo o que passei e aprendi em cinco anos de Cassino, uma experiência de vida que jamais esquecerei.

A todos aqueles que rezaram e torceram por mim durante esse tempo e a todos aqueles que fizeram parte da minha vida em Rio Grande, por tudo o que convivemos juntos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 AS CIANOBACTÉRIAS	12
1.1.1 TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS	12
1.1.2 FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS	14
1.2 A LAGOA DOS PATOS	15
1.2.1 A CIANOBACTÉRIA <i>Microcystis aeruginosa</i> NA LAGOA DOS PATOS	15
1.2.2 O CAMARÃO ROSA <i>Farfantepenaeus paulensis</i> NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS	17
1.3 OBJETIVOS DO TRABALHO	18
2 FLORAÇÕES NOCIVAS DE <i>Microcystis aeruginosa</i> NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS, RS: VERÃO DE 1998	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1 AMOSTRAGEM AMBIENTAL	20
2.2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO	20
2.2.3 PREPARO DOS EXTRATOS PARA OS TESTES DE TOXICIDADE	20
2.2.4 TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Artemia</i> sp.	21
2.3 RESULTADOS	22
2.4 DISCUSSÃO	23
3 INFLUÊNCIA DA SALINIDADE SOBRE A TOXICIDADE DE <i>Microcystis aeruginosa</i>	27
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1 CULTIVO DE <i>M. aeruginosa</i> EM LABORATÓRIO	27
3.2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	28
3.2.3 PREPARO DOS EXTRATOS PARA OS TESTES DE TOXICIDADE	28

3.2.4	TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Artemia</i> sp.	28
3.2.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS CULTIVOS SALINOS	29
3.3	RESULTADOS	30
3.4	DISCUSSÃO	32
<u>4 TOXICIDADE DE <i>Microcystis aeruginosa</i> SOBRE JUVENIS DO CAMARÃO ROSA <i>Farfantepenaeus paulensis</i></u>		<u>34</u>
4.1	INTRODUÇÃO	34
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1	CULTIVO DE <i>M. aeruginosa</i> EM LABORATÓRIO	35
4.2.2	PROCESSAMENTO DO MATERIAL ALGÁCEO DOS CULTIVOS	35
4.2.3	OBTENÇÃO DOS JUVENIS DE <i>F. paulensis</i>	35
4.2.4	PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>M. AERUGINOSA</i> PARA OS TESTES DE TOXICIDADE	35
4.2.5	TESTES DE TOXICIDADE	36
4.3	RESULTADOS	36
4.4	DISCUSSÃO	38
<u>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>		<u>40</u>
<u>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>		<u>42</u>
<u>ANEXOS</u>		<u>47</u>
ANEXO 1 - PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS		48
ANEXO 2 - PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE DAS AMOSTRAS SALINAS		53
ANEXO 3 - PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE ENVOLVENDO O CAMARÃO ROSA		56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA HEPATOTOXINA MICROCISTINA: UM HEPTAPEPTÍDEO (1-7) CÍCLICO, COM AS POSIÇÕES 2 E 4 VARIÁVEIS.	14
FIGURA 1.2 – MAPA DA LAGOA DOS PATOS COM AS CINCO UNIDADES BIOLÓGICAS PROPOSTAS POR ASMUS (1997): BAÍA DO GUAÍBA, BAÍA DE TAPES, LAGOA DO CASAMENTO, CORPO CENTRAL DA LAGOA E ESTUÁRIO.	16
FIGURA 2.1 – FLORAÇÃO TÓXICA DE <i>M. aeruginosa</i> NO ESTUÁRIO DA LAGOA DO PATOS, RS.	19
FIGURA 2.2 – LOCALIZAÇÃO DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM AO LONGO DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS.	21
FIGURA 2.3 – CURVA DE CRESCIMENTO DE FITOPLÂNCTON ESTABELECIDADA EM LABORATÓRIO. AS QUATRO FASES DE DESENVOLVIMENTO SÃO: FASE LOGARÍTMICA (1), FASE EXPONENCIAL (2), FASE ESTACIONÁRIA (3) E FASE DE DECLÍNIO OU MORTE (4).	26
FIGURA 3.1 – VARIAÇÃO DA TOXICIDADE (EM PESO SECO) DE <i>M. aeruginosa</i> EM RELAÇÃO À SALINIDADE DO MEIO DE CULTIVO. AS BARRAS REPRESENTAM O INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) EM TORNO DA MÉDIA, FORNECIDO PELO PROGRAMA TRIMMED SPEARMAN-KARBER.	31
FIGURA 3.2 – VARIAÇÃO DA TOXICIDADE DE <i>M. aeruginosa</i> EM RELAÇÃO À SALINIDADE DO MEIO DE CULTIVO, DADA PELAS CL ₅₀ -18h DOS TESTES COM <i>Artemia</i> sp. NORMALIZADOS PELO TEOR DE PROTEÍNAS. AS BARRAS REPRESENTAM O INTERVALO DE CONFIANÇA (95%).	31
FIGURA 3.3 – VARIAÇÃO DA TOXICIDADE DE <i>M. aeruginosa</i> EM RELAÇÃO À SALINIDADE DO MEIO DE CULTIVO. NORMALIZAÇÃO DE DADOS DOS DOIS EXPERIMENTOS: RAZÃO ENTRE CL ₅₀ -18h DAS AMOSTRAS E CL ₅₀ -18h DO CULTIVO EM SALINIDADE 0, DE CADA EXPERIMENTO.	33
FIGURA 4.1 – CULTIVOS EXPERIMENTAIS DO CAMARÃO ROSA <i>F. paulensis</i> EM ENSEADAS RASAS NA ILHA DA TOROTAMA (ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS). CULTIVOS FEITOS EM CERCADO PELA ESTAÇÃO MARINHA DE AQUACULTURA (EMA) DA FURG.	34
FIGURA 5.1 – CULTIVOS EXPERIMENTAIS DO CAMARÃO ROSA <i>Farfantepenaeus paulensis</i> EM ENSEADAS RASAS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS. CULTIVOS FEITOS EM GAIOLAS FLUTUANTES PELA ESTAÇÃO MARINHA DE AQUACULTURA (EMA) DA FURG.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – PRINCIPAIS GÊNEROS DE OCORRÊNCIA DAS NEUROTOXINAS E HEPATOTOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS.	13
TABELA 2.1 – VALORES DE CL ₅₀ -18h (mg·ml ⁻¹ p. s.) OBTIDOS NOS TESTES DE TOXICIDADE REALIZADOS COM AS AMOSTRAS AMBIENTAIS COLETADAS NO VERÃO DE 1998.....	23
TABELA 2.2 – RESULTADOS DO CONTROLE REALIZADO EM CADA BATERIA DE TESTE E ENUMERAÇÃO DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS TESTADAS.....	23
TABELA 2.3 – NÍVEIS DE TOXICIDADE DE AMOSTRAS CONTENDO HEPATOTOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS. FONTE: LAWTON ET AL. (1994).....	24
TABELA 2.4 – TOXICIDADE DAS FLORAÇÕES DE <i>M. aeruginosa</i> NA LAGOA DOS PATOS NOS PERÍODOS VERÃO/OUTONO 1993-1994, 1994-1995 E 1995-1996. VALORES DAS CL ₅₀ -18h (EM TESTES COM NÁUPLIOS DE <i>Artemia</i> sp.) E RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%).	25
TABELA 2.5 – TOXICIDADE MÉDIA DAS FLORAÇÕES DE <i>M. aeruginosa</i> NA LAGOA DOS PATOS NOS ÚLTIMOS CINCO ANOS. VALORES MÉDIOS DE CL ₅₀ -18h (mg·ml ⁻¹ p. s.) EM TESTES COM NÁUPLIOS DE <i>Artemia</i> sp. E NÚMERO DE AMOSTRAS TESTADAS EM CADA PERÍODO (N).	26
TABELA 3.1 – RESULTADOS DOS CONTROLES DOS TESTES DE TOXICIDADE COM AS AMOSTRAS SALINAS. MORTALIDADE EM CADA UMA DAS BATERIAS DE TESTE (EXPERIMENTOS I E II).....	30
TABELA 4.1 – RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE COM <i>Artemia</i> sp. PARA O EXTRATO DE <i>M. aeruginosa</i>	37
TABELA 4.2 – TOXICIDADE DO EXTRATO DE <i>Microcystis aeruginosa</i> PARA <i>Artemia</i> sp. E JUVENIS DE <i>Farfantepenaeus paulensis</i> . VALORES DE CL ₅₀ E RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%). A ABREVIATURA “n. c.” REPRESENTA UM VALOR NÃO CALCULÁVEL PELO PROGRAMA TRIMMED SPEARMAN KARBBER.	37
TABELA 4.3 – RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE COM <i>F. paulensis</i> PARA O EXTRATO DE <i>M. aeruginosa</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

3500g	3500 vezes a força da gravidade
10000g	10000 vezes a força da gravidade
A. P.	antes do presente
CL ₅₀ -18h	concentração letal a 50% dos organismos expostos ao teste, num período de 18 horas
CL ₅₀ -24h	concentração letal a 50% dos organismos expostos ao teste, num período de 24 horas
CL ₅₀ -48h	concentração letal a 50% dos organismos expostos ao teste, num período de 48 horas
DL ₅₀ -24h	dose letal a 50% dos organismos expostos ao teste, num período de 24 horas
EMA	Estação Marinha de Aquicultura
FURG	Fundação Universidade do Rio Grande
HPLC-DAD	cromatografia líquida de alta performance, com detector de foto-diodo
microcistina-FR	microcistina com fenilalanina e arginina como aminoácidos 2 e 4
microcistina-LR	microcistina com leucina e arginina como aminoácidos 2 e 4
<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501	cultura unialgal da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> ; amostra coletada na estação Torotama (estuário da Lagoa dos Patos), no estado do Rio Grande do Sul (RST); primeira cepa isolada no ano de 1995 (9501)
N	tamanho da amostra
n. c.	não calculável
prot.	proteínas
p. s.	peso seco
r	coeficiente de correlação
UPC	Unidade de Pesquisas em Cianobactéria

RESUMO

As condições abióticas do estuário da Lagoa dos Patos, durante os meses de verão e início de outono, favorecem o desenvolvimento de florações tóxicas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Esta espécie, típica de ambientes límnicos, é produtora de hepatotoxinas (microcistinas), sendo relacionada a diversos eventos de intoxicação de organismos aquáticos e mamíferos terrestres (incluindo o homem). O presente trabalho visa aprofundar os estudos sobre as florações de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos, dando ênfase à influência da salinidade sobre sua toxicidade e alertando sobre os riscos que tais florações podem oferecer ao camarão rosa. Os resultados foram analisados baseando-se em testes de toxicidade com *Artemia* sp. (submetida a amostras de florações do estuário e de cultivos *in vitro* de *M. aeruginosa* sob diferentes salinidades) e com juvenis do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (amostra de *M. aeruginosa* cultivada em laboratório). As amostras ambientais demonstraram que as florações da cianobactéria têm apresentado média a alta toxicidade, expondo as águas do estuário à ação de suas toxinas. Com relação à presença de sal marinho em seu meio de cultivo, *M. aeruginosa* apresentou-se mais tóxica em pequenas salinidades (até 1,3) do que na própria salinidade 0, de onde é oriunda. Já os testes com juvenis de *F. paulensis* apresentaram uma CL_{50-24h} de $2,96 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, evidenciando a sensibilidade da espécie às toxinas de uma floração de *M. aeruginosa*. Tal sensibilidade não seria de marcada importância no ambiente natural, onde os organismos poderiam tentar evitar as florações (fugindo, enterrando-se). Porém deve ser ressaltado o risco que essas florações podem oferecer aos cultivos de camarão rosa no ambiente natural, principalmente àqueles feitos em gaiolas flutuantes, onde os organismos são cultivados próximo à superfície.

Palavras-chave: *Artemia* sp., cianobactéria, estuário da Lagoa dos Patos, florações de *Microcystis aeruginosa*, *Farfantepenaeus paulensis*, salinidade, toxicidade.

ABSTRACT

During summer and autumn months, abiotic conditions in the Patos Lagoon estuary favour the development of *Microcystis aeruginosa* toxic blooms. This freshwater specie produces hepatotoxins (microcystins) and has been associated with several intoxication events of aquatic organisms, terrestrial animals and man. The present paper studied the toxicity of *M. aeruginosa* blooms in the Patos Lagoon estuary, the influence of salinity and bloom hazards to pink shrimp. The results were based in toxicity tests involving *Artemia* sp. (samples from natural blooms and *M. aeruginosa* cultivated in laboratory at different salinities) and pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* juveniles (*M. aeruginosa* cultivated in laboratory at freshwater conditions). Bloom samples had a medium to a high toxicity subjecting estuarine waters to the action of *M. aeruginosa* toxins. In respect to the salinity of the culture medium, higher toxicity was found in low salinities (until 1.3) than in salinity zero. The assays involving *F. paulensis* juveniles had a LC_{50-24h} of 2.96 mg·ml⁻¹, confirming this specie sensitivity to toxins of *M. aeruginosa* natural blooms. This sensitivity may not be so important in the environment because the organisms could avoid blooms. On the contrary, toxic bloom should be considered real hazards to natural pink shrimp aquaculture, especially those made in flutuating cages where organisms are cultivated near water surface.

Key words: *Artemia* sp., cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* blooms, Patos Lagoon estuary, *Farfantepenaeus paulensis*, salinity, toxicity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, também chamadas algas azuis, algas cianofíceas e mais recentemente cianoprocariontes, são microorganismos autotróficos com estrutura e organização celular procariótica – caracterizada por ausência de membrana nuclear (carioteca) e organelas como cloroplastos e mitocôndrias. Também apresentam sistemas fotossintéticos semelhantes aos vegetais, porém organizados nos tilacóides, que além de conter pigmentos como clorofila e carotenóides, também possuem ficobiliproteínas (pigmentos acessórios característicos do grupo).

Em uma divisão taxonômica, as cianobactérias, juntamente com as bactérias, podem ser classificadas como pertencentes ao reino Prokaryotae, formado por todos os organismos procariontes. Já em termos evolutivos, elas são consideradas organismos intermediários entre as bactérias e os vegetais.

As cianobactérias têm uma longa história sobre a Terra. Seus primeiros fósseis em sedimentos datam de mais de três bilhões de anos A. P. (período Pré-Cambriano). Provavelmente, as cianobactérias foram os primeiros organismos a fixar o oxigênio livre na atmosfera primitiva, contribuindo para o estabelecimento da atual atmosfera oxidante do planeta (Fay, 1983). Atualmente, elas podem ser encontradas em diversos tipos de ambientes naturais, como solos úmidos e ambientes aquáticos. Fay (1983) ainda refere-se às cianobactérias como primeiros colonizadores de solos áridos, citando um caso onde, apenas dezoito meses após uma erupção vulcânica na ilha de Heimaey (próxima à Islândia), o gênero *Anabaena* foi encontrado crescendo e fixando N₂ em lava solidificada.

1.1.1 Toxinas de cianobactérias

A nível científico, as cianobactérias primeiramente foram estudadas por botânicos. Porém, nos últimos trinta anos, elas também passaram a ser estudadas por outros grupos de pesquisadores devido, principalmente, à produção de toxinas de gêneros como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium* (Skulberg et al., 1993).

Baseado no modo de ação, as toxinas de cianobactérias podem ser divididas em quatro grupos: dermatotoxinas, toxinas que causam disfunção gastrointestinal, neurotoxinas e hepatotoxinas (Rapala, 1998). As dermatotoxinas e as toxinas que causam disfunção gastrointestinal estão associadas a irritações na pele e mucosas e a intoxicações gastrointestinais, respectivamente. Ambos os grupos possuem as mesmas toxinas, que dependendo da forma de absorção agem em diferentes tecidos do organismo. Tais grupos de toxinas podem ser representados pela aplisiatoxina, debromoaplisiatoxina, lingbiatoxina A (encontradas em *Lyngbya*) (Mynderse et al., 1977; Cardellina et al., 1979) e pelos lipopolissacarídeos (LPS), que são compostos presentes na membrana externa da parede celular dos procariontes gram-negativos, como as cianobactérias. As neurotoxinas (Tabela 1.1), em geral, são compostos alcalóides (anatoxinas), e têm ação sobre o sistema nervoso dos organismos atingidos. Seus sinais de envenenamento em animais incluem paralisia, dificuldade respiratória, tremor muscular, salivação, tonturas e convulsões, podendo acarretar morte em poucos minutos (Pearson, 1990). Finalmente, as hepatotoxinas (Tabela 1.1), geralmente compostas por peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas), têm ação principal sobre tecidos hepáticos, podendo, ainda, afetar os rins e o coração, como é o caso da cilindrospermopsina (Terao et al., 1994). Entre seus sinais de envenenamento pode-se incluir fraqueza, vômito, resfriamento de extremidades, piloereção, diarreia e respiração ofegante, levando à morte em poucas horas (Pearson, 1990).

Tabela 1.1 – Principais gêneros de ocorrência das neurotoxinas e hepatotoxinas de cianobactérias.

GRUPO	TOXINA	PRINCIPAIS GÊNEROS DE OCORRÊNCIA
Neurotoxinas	Anatoxina-a	<i>Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon</i>
	Homoanatoxina-a	<i>Oscillatoria</i>
	Anatoxina-a(S)	<i>Anabaena</i>
	Toxinas PSP (paralytic shellfish poisoning)	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya</i> e <i>Cylindrospermopsis</i>
Hepatotoxinas	Microcistina	<i>Microcystis, Oscillatoria</i> e <i>Anabaena</i>
	Nodularina	<i>Nodularia</i>
	Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Aphanizomenon</i>

Dentre as toxinas mais comuns das cianobactérias pode-se destacar a hepatotoxina microcistina. Sua estrutura geral é caracterizada por um heptapeptídeo cíclico, cujas posições 2 e 4 apresentam diversas combinações de aminoácidos (Figura

1.1). Atualmente, são conhecidas 48 variantes de microcistinas, mas esse número excederá 60 variantes quando as toxinas parcialmente descritas forem totalmente caracterizadas (Sivonen, 1996).

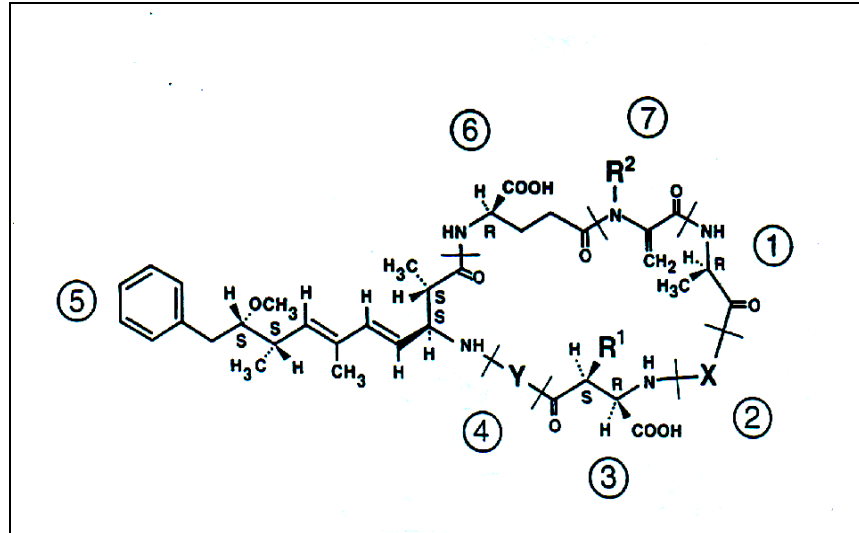


Figura 1.1 – Estrutura química da hepatotoxina microcistina: um heptapeptídeo (1-7) cíclico, com as posições 2 e 4 variáveis.

1.1.2 Florações de cianobactérias

Quando as condições ambientais favorecem seu crescimento, as cianobactérias podem se desenvolver rapidamente formando grandes concentrações na água, conhecidas como florações (Torgan, 1989). Estas, caracterizam-se pelo domínio de uma ou duas espécies de cianofíceas sobre toda a comunidade fitoplanctônica do ambiente aquático. As florações de cianobactérias têm sido reportadas em todas as partes do mundo e nos mais variados ecossistemas aquáticos, sendo muitas delas tóxicas (Kononen & Sellner, 1995).

As florações tóxicas de cianobactérias têm sido alvo de amplo estudo por parte da comunidade científica, principalmente devido a seus efeitos deletérios. Tais efeitos podem atingir animais domésticos, selvagens e também o homem (Carmichael & Falconer, 1993). Na literatura internacional, há diversos registros de envenenamento de gado, cavalos, porcos, ovelhas, cães, peixes e invertebrados atribuídos à ingestão ou contato com essas florações tóxicas (Carmichael, 1995). No homem, a exposição a estas toxinas também acarreta graves consequências. Uma exposição a doses subletais pode

desencadear, a longo prazo, o desenvolvimento de tumores cancerígenos (Falconer, 1993). Já um efeito agudo pode levar à morte, como ocorrido no Instituto de Doenças Renais (Caruaru, Brasil), onde 60 pessoas morreram com sinais e sintomas de neurotoxicidade aguda e hepatotoxicidade subaguda provocada por microcistinas (Pouria et al., 1998).

1.2 A LAGOA DOS PATOS

A Lagoa dos Patos, situada na planície costeira do Rio Grande do Sul, é o maior corpo de água lagunar do Brasil. Segundo Kjerfve (1986), a Lagoa dos Patos é do tipo estrangulada (“choked lagoons”), sendo considerada a maior do gênero no mundo. Com uma área superficial de 10227 km², funciona como o corpo receptor de uma bacia de drenagem de 201626 km² (Asmus, 1997), o que representa aproximadamente metade da área do estado do Rio Grande do Sul.

Segundo Asmus (1997), a Lagoa dos Patos pode ser dividida em cinco unidades biológicas: a Baía do Guaíba, a Baía de Tapes, a Lagoa do Casamento, o corpo central da Lagoa e o estuário (Figura 1.2). Este último, compreende uma área de 971 km² (cerca de 10% da Lagoa) que troca água com o Oceano Atlântico através de um canal de 20 km de comprimento por 0,5 a 3 km de largura (Asmus, 1997). As áreas marginais, rasas e protegidas, e o corpo de água central do estuário, que possui um profundo canal para navegação, constituem dois ambientes ecológicos bastante distintos (Bonilha & Asmus, 1994).

1.2.1 A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* na Lagoa dos Patos

A comunidade fitoplanctônica que compõe a Lagoa dos Patos pode ser considerada heterogênea em relação ao seu eixo longitudinal. As cianobactérias constituem um dos mais importantes taxa entre o fitoplâncton que compõe o sistema, destacando-se pela densidade e/ou biomassa em determinados períodos. Em um ciclo anual, Torgan (1997) identificou dezoito gêneros de cianobactérias em toda a extensão da Lagoa dos Patos. No estuário, apenas os gêneros *Aphanothece* (nas áreas rasas) e *Microcystis* (nas áreas mais profundas) são capazes de desenvolver grandes concentrações na água.

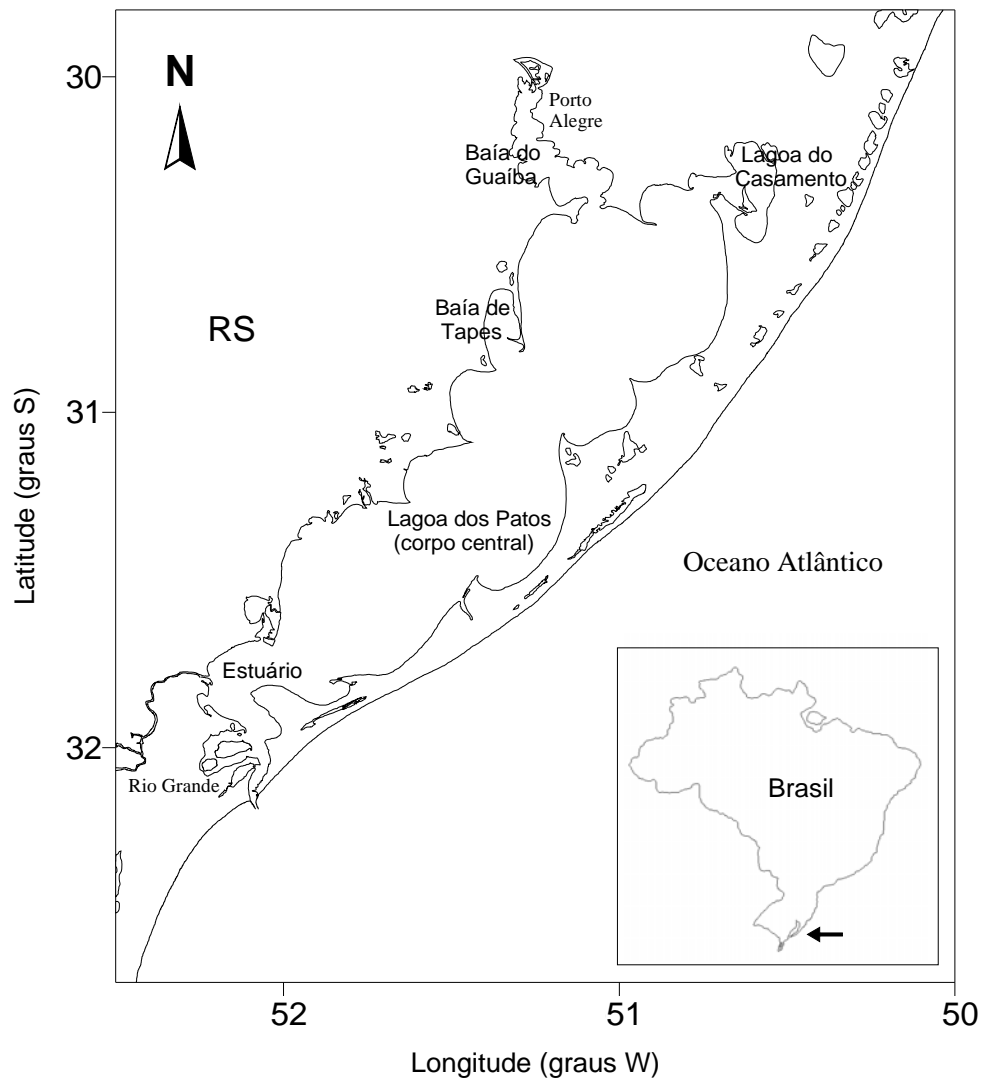


Figura 1.2 – Mapa da Lagoa dos Patos com as cinco unidades biológicas propostas por Asmus (1997): Baía do Guaíba, Baía de Tapes, Lagoa do Casamento, corpo central da Lagoa e estuário.

Florações de *M. aeruginosa* têm sido observadas nas últimas duas décadas no estuário da Lagoa dos Patos (Odebrecht et al., 1987; Yunes et al., 1996). Segundo Yunes et al. (1998a), a combinação entre o balanço de nutrientes, os parâmetros físicos da água e as condições meteorológicas são responsáveis pela geração de condições de crescimento ideais para *M. aeruginosa*, nas massas de água que alcançam o estuário.

Matthiensen (1996) identificou a presença de colônias de *M. aeruginosa* durante praticamente todo o ano nas águas do estuário da Lagoa dos Patos, com florações desenvolvendo-se nos meses de verão e início de outono. Como já era esperado, devido aos diversos registros observados na literatura internacional, tais florações revelaram-se tóxicas

em testes com camundongos e microcrustáceos do gênero *Artemia* (Yunes et al., 1996). Yunes et al. (1998b) identificaram, através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC-DAD), a presença de quatro variantes de microcistina nas florações, encontrando microcistina-LR e provavelmente microcistina-FR como as mais abundantes nas células e em amostras de água, respectivamente.

Segundo Calliari (1980), o estuário da Lagoa dos Patos pode apresentar condições de estratificação halina acentuada ou moderada, alternando entre bruscas variações de salinidade (até 20 unidades em uma hora) e situações de grande homogeneidade. Provavelmente, tal característica é a responsável pela menor diversidade, densidade, biomassa e riqueza de espécies fitoplanctônicas em relação à área norte da lagoa (Torgan, 1997). *M. aeruginosa* é uma espécie de água doce que atinge o estuário proveniente das águas à montante da Lagoa dos Patos. Apesar disso, a espécie possui mecanismos de adaptação à salinidade do estuário, visto que consegue sobreviver, crescer e, até mesmo, desenvolver florações tóxicas em suas águas salobras. Tais mecanismos de adaptação ainda não são bem conhecidos pela comunidade científica. Fistarol (1997), através de experimentos realizados em laboratório, concluiu que *M. aeruginosa* consegue crescer em meio com salinidade inferior a 2.

As águas do estuário da Lagoa dos Patos são de grande valor e econômico para as populações que vivem em suas margens, sendo exploradas a nível de pesca, transporte, lazer e turismo. A existência de um grande número de fontes de efluentes orgânicos nas margens da cidade de Rio Grande (Almeida et al., 1993) e o fato de que a maioria das espécies marinhas de valor comercial penetram no estuário nos meses mais quentes do ano contribuem para aumentar a atenção às florações tóxicas de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos.

1.2.2 O camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* no estuário da Lagoa dos Patos

O estuário da Lagoa dos Patos possui uma fauna bastante diversificada, sendo também um importante criadouro para espécies marinhas e límnicas. Dentre sua variada fauna pode-se destacar o crustáceo decápodo *Farfantepenaeus paulensis*, popularmente conhecido como camarão rosa.

A área de distribuição da espécie na costa brasileira estende-se do sul de Ilhéus (Bahia) até o Chuí (Rio Grande do Sul) (D’Incao, 1995). Na Lagoa dos Patos, apenas juvenis e pré-adultos são encontrados (D’Incao, 1991), sendo que a penetração no

estuário é feita por pós-larvas a partir do subestágio 6 (Iwai, 1978). A origem desses indivíduos, muito provavelmente, é o estoque de adultos existente no litoral de Santa Catarina (D’Incao, 1991). O estuário da Lagoa dos Patos caracteriza-se como uma área de criação da espécie, onde os organismos permanecem até a idade de recrutamento para o estoque adulto oceânico (D’Incao, 1991). Assim, esse estuário pode ser considerado um imenso berçário onde as larvas crescem, passam pela fase juvenil e atingem o tamanho adulto em poucos meses (Marchiori, 1996).

Além de sua importância ecológica para o estuário, o camarão rosa *F. paulensis* também é o mais importante recurso econômico para a pesca da região. A grande variabilidade de sua safra, ocasionada por fatores ambientais, é responsável por problemas econômicos e sociais junto à comunidade de pescadores que vive às margens do estuário (D’Incao, 1991). E agravando ainda mais a situação, estudos desenvolvidos por Valentini et al. (1991) concluíram que todo o recurso encontra-se sobreexplorado, sugerindo inclusive um provável colapso da pescaria. Em contrapartida, a aquicultura surge como uma nova alternativa para a pescaria do camarão rosa na Lagoa dos Patos. Atualmente, a Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) desenvolve estudos experimentais para o repovoamento do camarão no estuário, através da liberação de juvenis de *F. paulensis* nas enseadas rasas do mesmo. Também estão sendo desenvolvidos estudos experimentais de cultivo de camarão rosa em cercados e gaiolas, nas enseadas rasas do estuário. A longo prazo, com o aperfeiçoamento da técnica, essa tecnologia deve ser transferida para os pescadores artesanais da região (Ferraz, 1997).

1.3 OBJETIVOS DO TRABALHO

Conforme os aspectos ressaltados na introdução acima, o presente trabalho objetiva:

- contribuir aos estudos existentes a respeito da cianobactéria tóxica *M. aeruginosa* e seu papel ecológico no estuário da Lagoa dos Patos;
- verificar a toxicidade das florações de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos em diferentes períodos;
- avaliar o efeito da salinidade sobre a toxicidade de *M. aeruginosa* cultivada em laboratório;
- determinar a toxicidade de *M. aeruginosa* sobre juvenis do camarão rosa *F. paulensis*.

2 FLORAÇÕES NOCIVAS DE *Microcystis aeruginosa* NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS, RS: VERÃO DE 1998

2.1 INTRODUÇÃO

Florações de cianobactérias tóxicas têm sido registradas em ambientes de água doce, salobra e marinha em diversas partes do mundo (Codd, 1998). No estuário da Lagoa dos Patos, diversas florações de *M. aeruginosa* (Figura 2.1) têm sido observadas nas últimas duas décadas (Odebrecht et al., 1987; Yunes et al., 1996).

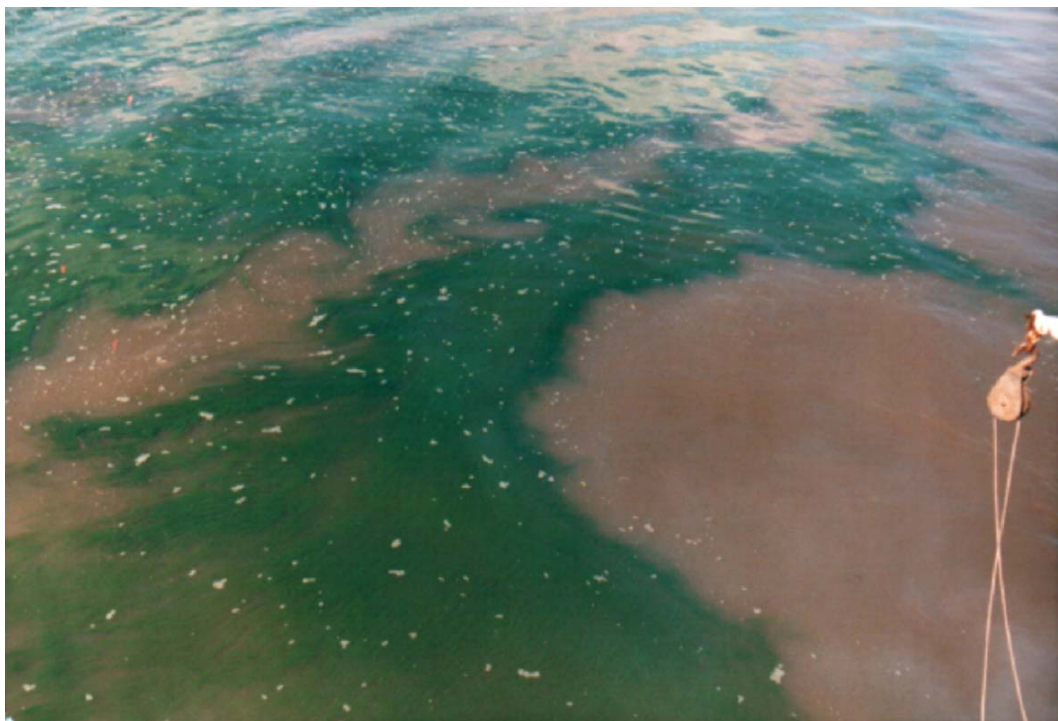


Figura 2.1 – Floração tóxica de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa do Patos, RS.

O estuário compreende uma área de 971 km², o que representa cerca de 10% da área total da Lagoa dos Patos (Asmus, 1997). Ecologicamente, ele é considerado um grande berçário natural para o desenvolvimento de inúmeras espécies límnicas e marinhas. Ao longo de suas margens há centros urbanos, rurais e industriais, que utilizam-se de suas águas para fins de recreação, pesca e navegação, entre outros. Durante os meses de verão e

início de outono, uma combinação entre o balanço de nutrientes (razão N/P próxima a 13:1) e os parâmetros físicos da água (temperaturas superiores a 20 °C, pH em torno de 8,0 e água doce) podem ocasionar condições ideais para o crescimento de *M. aeruginosa* nas massas de água que atingem o estuário da Lagoa dos Patos (Yunes et al., 1998a).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostragem ambiental

Os testes de toxicidade das florações de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos foram feitos em 12 amostras coletadas entre janeiro e março de 1998 (período de verão e início de outono). Estas amostras foram coletadas durante cruzeiros a bordo da Lancha Larus da FURG, nas seguintes estações ao longo do estuário: Feitoria, Farolete, São Gonçalo, Marambaia, Saco do Mendanha e Bóia do Casco Soçobrado (Figura 2.2). Em cada local de amostragem foram feitos arrastos com rede de plâncton (malha de 55 µm), os quais forneceram material para os testes de toxicidade.

2.2.2 Processamento das amostras em laboratório

Logo após o retorno ao laboratório, todas as amostras foram armazenadas em freezer a -25 °C. Conforme a disponibilidade elas foram preparadas para liofilização (Micromodulyo – Edwards) a -30 °C, sendo o material liofilizado acondicionado novamente em freezer até a sua utilização nos testes de toxicidade.

2.2.3 Preparo dos extratos para os testes de toxicidade

Para a execução dos testes de toxicidade foram preparados, a partir do material liofilizado, extratos aquosos (concentrados) no mesmo meio de cultivo dos organismos-teste (no caso, microcrustáceos do gênero *Artemia*).

A fim de promover o rompimento das células do material liofilizado, todos os extratos sofreram três sonificações (High Intensity Ultrasonic Processor, 50 Watt Model, 20 kHz) de um minuto cada – em baixa temperatura (inferior a 10 °C) – intercaladas com ciclos de congelamento/descongelamento. Após esse tratamento, os extratos foram centrifugados a aproximadamente 10000g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante removido e armazenado em freezer a -25 °C até sua utilização nos testes.

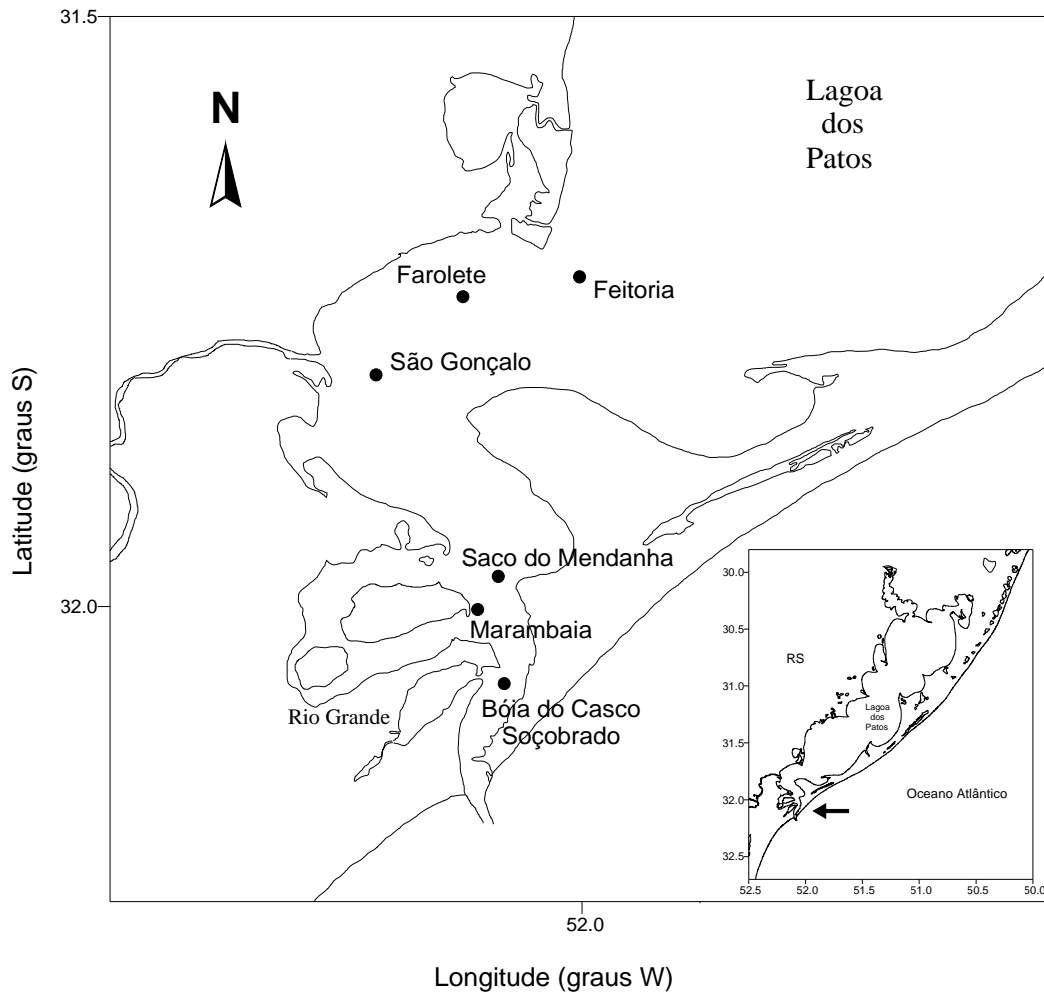


Figura 2.2 – Localização das estações de amostragem ao longo do estuário da Lagoa dos Patos.

2.2.4 Testes de toxicidade com *Artemia* sp.

Para a execução dos testes de toxicidade foram eclodidos náuplios de *Artemia* sp. (Prime Artemia Incorporated - Utah, USA) em laboratório. Para eclosão, os cistos foram colocados em frascos erlenmeyer com 100 ml de meio de cultivo (água do mar reconstituída em salinidade 33), conforme modelo proposto por Harwig & Scott (1971). Os frascos foram mantidos por 24 horas em câmara incubadora tipo DBO a temperatura de 25 ± 1 °C, luminosidade constante e sem aeração. Após esse período, os náuplios eclodidos foram transferidos para outro erlenmeyer com 100 ml de meio de cultura (a fim de separá-los dos cistos não eclodidos e das cascas dos cistos eclodidos), onde permaneceram por mais 24 horas para aclimação nas mesmas condições acima

mencionadas. Terminado o período de aclimação, os organismos (náuplios de *Artemia* sp. 24 horas após sua eclosão) foram utilizados nos testes de toxicidade.

Nos testes, os náuplios de *Artemia* sp. foram expostos a oito concentrações crescentes de *M. aeruginosa*, obtidas de diluições feitas a partir do extrato concentrado. Em cada bateria, paralelamente aos testes das amostras ambientais, foi realizado um controle, visando observar a sobrevivência dos náuplios nas condições de teste.

Todos os testes foram feitos em placas de poliestireno (com 96 poços de 300 µl cada) previamente lavadas abundantemente em água corrente, água destilada e água destilada e deionizada. Em cada poço-teste foram colocados em média 18 indivíduos (N = 408). Todos os testes das amostras ambientais foram realizados com três réplicas para cada concentração de exposição dos organismos, enquanto o controle foi feito com 24 réplicas. Os testes de toxicidade tiveram duração de 18 horas, depois das quais fez-se a contagem dos indivíduos mortos sob microscópio estereoscópico. Como critério de mortalidade usou-se a imobilidade dos náuplios durante aproximadamente 10 segundos. Após essa primeira contagem, todos os indivíduos foram mortos pela adição de 100 µl de fenol 5% (v/v) em cada poço-teste, sendo feita a contagem do total de organismos em cada réplica. A partir dos resultados foram calculadas as CL₅₀-18h de cada amostra, através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Os valores de CL₅₀-18h foram expressos em miligramas de peso algáceo seco por mililitro de solução (mg·ml⁻¹ p. s.).

2.3 RESULTADOS

A toxicidade das amostras ambientais sobre os náuplios de *Artemia* sp. está representada na Tabela 2.1, que inclui as CL₅₀-18h de cada teste e seus respectivos intervalos de confiança (95%). Os resultados dos testes de toxicidade apresentaram variação da CL₅₀-18h entre 0,71 mg·ml⁻¹ e 5,67 mg·ml⁻¹. Entre as doze amostras testadas, dez (83,33%) resultaram em CL₅₀-18h inferior a 3,00 mg·ml⁻¹. Já os controles realizados em cada bateria de teste evidenciaram todos menos de 10% de mortes dos náuplios expostos (Tabela 2.2). Esse resultado pode ser considerado satisfatório, não invalidando os testes (Salomon, 1996).

Tabela 2.1 – Valores de CL₅₀-18h (mg·ml⁻¹ p. s.) obtidos nos testes de toxicidade realizados com as amostras ambientais coletadas no verão de 1998.

AMOSTRA	ESTAÇÃO DE COLETA	DATA	CL ₅₀ -18h (mg·ml ⁻¹)	INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)
1	Feitoria	07/01/98	0,71	0,65-0,78
2	São Gonçalo	07/01/98	5,67	5,04-6,37
3	Bóia do Casco Soçobrado	08/01/98	2,36	1,63-3,41
4	Saco do Mendanha	08/01/98	3,36	2,98-3,78
5	Farolete	16/03/98	1,41	1,25-1,58
6	Feitoria	16/03/98	2,34	2,09-2,63
7	Marambaia	16/03/98	2,76	2,18-3,51
8	São Gonçalo	16/03/98	0,76	0,54-1,07
9	Farolete	30/03/98	1,47	1,29-1,66
10	Feitoria	30/03/98	1,99	1,80-2,19
11	Marambaia	30/03/98	2,84	2,53-3,18
12	São Gonçalo	30/03/98	1,58	1,45-1,72

Tabela 2.2 – Resultados do controle realizado em cada bateria de teste e enumeração das respectivas amostras testadas.

BATERIA DE TESTE	AMOSTRAS TESTADAS	CONTROLE (% DE MORTOS)
I	1	3,93
II	3, 7 e 8	2,87
III	9, 10, 11 e 12	8,66
IV	2, 4 e 6	9,72
V	5	3,81

2.4 DISCUSSÃO

De acordo com a classificação proposta por Lawton et al. (1994) (Tabela 2.3), os resultados obtidos no verão de 1998 apresentaram de média a alta toxicidade. Das doze amostras testadas, seis (50%) tiveram CL₅₀-18h inferior a 2 mg·ml⁻¹, o que representa alta toxicidade. Enquanto as outras seis (50%) evidenciaram média toxicidade (entre 2 e 10

mg·ml⁻¹), sendo que a amostra menos tóxica resultou em uma CL₅₀-18h de 5,67 mg·ml⁻¹ (Tabela 2.1).

Tabela 2.3 – Níveis de toxicidade de amostras contendo hepatotoxinas de cianobactérias. Fonte: Lawton et al. (1994).

GRAU DE TOXICIDADE	CAMUNDONGO DL ₅₀ -24h (mg·kg ⁻¹)	<i>Artemia</i> sp. CL ₅₀ -18h (mg·ml ⁻¹)	HPLC-DAD (mg·g ⁻¹)
NÃO TÓXICO	> 1000	> 30	< 0,01
BAIXO	> 500 < 1000	> 10 < 30	> 0,01 < 0,1
MÉDIO	> 100 < 500	> 2 < 10	> 0,1 < 1,0
ALTO	< 100	< 2	> 1,0

Comparando-se os resultados deste trabalho (Tabela 2.1) com os resultados obtidos por Salomon (1996) na Lagoa dos Patos (Tabela 2.4), pode-se observar que a toxicidade das amostras de *M. aeruginosa* em 1998 apresenta-se superior. Analisando-se a média das CL₅₀-18h dos últimos cinco anos (Tabela 2.5), o verão de 1998 também apresenta-se como o de mais alta toxicidade média, resultado que torna-se mais significativo pelo elevado número de amostras testadas (N = 12).

A respeito da maior toxicidade das amostras de floração de *M. aeruginosa* no verão de 1998, em relação aos anos anteriores, deve-se ressaltar dois aspectos importantes. Primeiro, o resultado das CL₅₀-18h obtidas neste trabalho não significam que as florações de *M. aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos no verão de 1998 foram mais tóxicas que as florações dos cinco anos anteriores. Os valores de CL₅₀-18h presentes na Tabela 2.1 representam apenas a toxicidade de amostras pontuais coletadas no estuário, refletindo as condições do ambiente naqueles instantes de tempo e espaço. Segundo, uma possível explicação para a maior toxicidade das amostras do verão de 1998 é o fato de que as florações deste ano possuíam menor biomassa que as florações de *M. aeruginosa* em anos anteriores, no momento de coleta das amostras (Yunes¹, com. pessoal). Isso pode ser melhor elucidado através da observação da curva de crescimento de espécies fitoplanctônicas (Figura 2.3). Essa curva foi estabelecida em laboratório, mas pode ser extrapolada para o desenvolvimento de florações no ambiente natural. Provavelmente, amostras coletadas em maio de 1994, quando Yunes et al. (1996) encontraram valores de

¹ Dr. João Sarkis Yunes. Fundação Universidade do Rio Grande, Departamento de Química, Unidade de Pesquisas em Cianobactéria. Caixa Postal 474, Rio Grande, RS, Brasil, CEP: 96201-900. E-mail: dqmsarks@super.furg.br

clorofila *a* superiores a $9000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ associados a baixos níveis de toxicidade no estuário, estavam representando a fase estacionária da floração, onde a taxa de divisão das células é igual a taxa de mortalidade das mesmas e as células rompidas liberam suas toxinas na água. Enquanto isso, as amostras coletadas em 1998, provavelmente, representavam o início da fase exponencial das florações, quando elas ainda não são visíveis a olho nú, as células estão no seu estado ótimo de metabolismo e todas as toxinas estão presentes no interior das células.

Tabela 2.4 – Toxicidade das florações de *M. aeruginosa* na Lagoa dos Patos nos períodos verão/outono 1993-1994, 1994-1995 e 1995-1996. Valores das $\text{CL}_{50-18\text{h}}$ (em testes com náuplios de *Artemia* sp.) e respectivos intervalos de confiança (95%).

ESTAÇÃO DE COLETA	DATA	$\text{CL}_{50-18\text{h}}$ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)
Rio Grande Yacht Club	17/03/94	8,09	7,10-9,21
São José do Norte	17/03/94	4,44	3,88-5,09
Molhes da Barra (dentro do canal)	24/03/94	14,65	12,39-17,33
Clube de Regatas de Rio Grande	28/03/94	6,59	5,68-7,66
Ponte dos Franceses	28/03/94	6,06	5,32-6,90
Coroa dos Patos	24/05/94	43,96	37,35-51,75
Ilha da Torotama	24/05/94	7,74	6,70-8,94
Pelotas - Barra Falsa	24/05/94	41,85	32,46-53,95
Ponta da Feitoria	24/05/94	14,16	12,09-16,58
Porteiras	24/05/94	27,36	21,57-34,72
Próximo ao Canal de São Gonçalo	24/05/94	19,68	15,01-25,80
Praia do Cassino	26/05/94	6,79	5,72-8,05
Saco da Mangueira	10/06/94	21,91	17,87-26,86
Barra do Rio Grande	20/12/94	4,04	3,46-4,70
Marambaia	20/12/94	3,04	2,56-3,61
Rio Grande Yacht Club	20/12/94	4,60	4,01-5,29
Rio Grande Yacht Club	19/02/95	7,60	6,46-8,95
Banco Dona Maria	27/02/96	5,70	4,74-6,86
Farolete	27/02/96	9,14	7,85-10,64

Os resultados observados na Lagoa dos Patos corroboram os estudos promovidos por Park et al. (1998) em um lago supereutrófico no Japão. Também Berg et al. (1987), estudando *in vitro* os efeitos da degradação de florações tóxicas sobre a qualidade de água, afirmam que no início do desenvolvimento das florações as toxinas concentram-se apenas dentro das células de *M. aeruginosa*. Com o passar do tempo e início da decomposição das mesmas (rompimento celular), as toxinas passam a ser liberadas na água, sendo em poucos dias degradadas pela flora bacteriana.

Tabela 2.5 – Toxicidade média das florações de *M. aeruginosa* na Lagoa dos Patos nos últimos cinco anos. Valores médios de CL₅₀-18h (mg·ml⁻¹ p. s.) em testes com náuplios de *Artemia* sp. e número de amostras testadas em cada período (N).

PERÍODO DE VERÃO/OUTONO	MÉDIA DAS CL ₅₀ -18h (mg·ml ⁻¹)	AMOSTRAS TESTADAS (N)
1993/1994	17,18	13
1994/1995	4,82	4
1995/1996	7,42	2
1996/1997	-	-
1997/1998	2,27	12

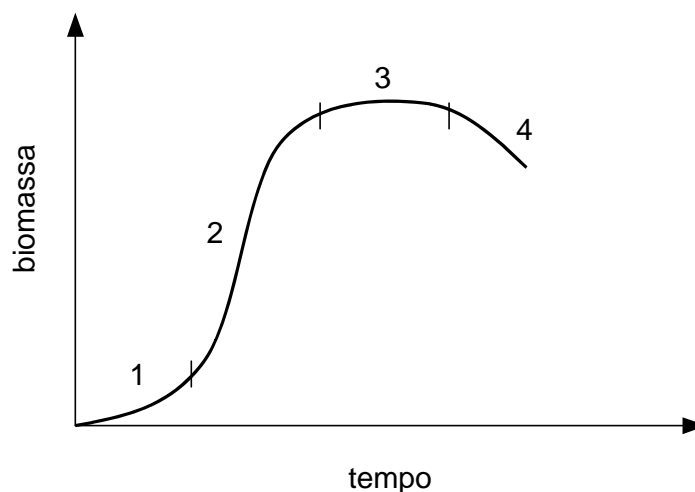


Figura 2.3 – Curva de crescimento de fitoplâncton estabelecida em laboratório. As quatro fases de desenvolvimento são: fase logarítmica (1), fase exponencial (2), fase estacionária (3) e fase de declínio ou morte (4).

3 INFLUÊNCIA DA SALINIDADE SOBRE A TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa*

3.1 INTRODUÇÃO

O estuário da Lagoa dos Patos pode apresentar estratificação halina acentuada ou moderada, alternando entre variações bruscas de salinidade e situações de grande homogeneidade (Calliari, 1980). A hidrodinâmica das águas estuarinas é mais intensa nos canais, sendo influenciada pelas interações entre os regimes pluviométrico e de ventos, que alteram o nível da lagoa definindo os regimes de enchente e vazante (Möller et al., 1991).

A cianobactéria *M. aeruginosa* é uma espécie de água doce que já produziu florações tóxicas nas águas salobras do estuário (Yunes et al., 1996), alcançando-o proveniente das massas de água à montante da Lagoa dos Patos. Nele, as colônias de *M. aeruginosa* entram em contato com a frente salina. Ainda não se conhece totalmente seus mecanismos de tolerância a gradientes de salinidade, devendo ser alvo de estudos mais aprofundados. Fistarol (1997), através de experimentos *in vitro*, concluiu que *M. aeruginosa* pode crescer em meio com salinidade inferior a 2.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cultivo de *M. aeruginosa* em laboratório

O material algáceo utilizado neste trabalho foi obtido de cultivos realizados em laboratório por Fistarol (1997), que investigou a influência da salinidade sobre o crescimento de *M. aeruginosa*. Os cultivos salinos dessa autora foram feitos a partir da cepa *Microcystis aeruginosa* RST9501, isolada do estuário da Lagoa dos Patos e mantida no banco de culturas da Unidade de Pesquisas em Cianobactéria (UPC) da FURG. Eles foram realizados em meio BG11 com 8,8 mM de NaNO₃ (modificado de Rippka et al., 1979) e mantidos em câmara incubadora tipo DBO sob condições controladas (temperatura de 28 ± 1 °C, pH 8,0, luminosidade de aproximadamente 16 µE·m⁻²·s⁻¹, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro) e aeração constante.

Os cultivos foram divididos em dois experimentos. O primeiro foi feito com as salinidades 0, 0,5 e 1,0, enquanto o segundo com 0, 0,25, 1,3 e 1,7. Em ambos, tomou-se o meio de cultura BG11 como controle, admitindo-o como salinidade 0. A partir disso, adicionou-se sal marinho aos demais meios para ajustá-los aos intervalos de salinidade listados acima.

3.2.2 Processamento das amostras

Terminados os experimentos, descritos mais detalhadamente em Fistarol (1997), todas as amostras foram armazenadas em freezer a -25 °C. Conforme a disponibilidade elas foram preparadas para liofilização (Micromodulyo – Edwards) a -30 °C, sendo o material liofilizado acondicionado novamente em freezer até a sua utilização nos testes de toxicidade.

3.2.3 Preparo dos extratos para os testes de toxicidade

Para a execução dos testes de toxicidade foram preparados, a partir do material liofilizado, extratos aquosos no mesmo meio de cultivo dos organismos-teste (náuplios de *Artemia* sp.). Todos os extratos-mãe foram preparados na concentração estoque de 100 mg·ml⁻¹ de peso seco.

A fim de promover o rompimento das células do material liofilizado, os extratos sofreram três sonificações de quinze minutos cada, a baixa temperatura (inferior a 10 °C), em banho de ultrassom (Sonorex TK 30 – Bandelin Eletronic, Alemanha, 50 kHz), intercaladas com ciclos de congelamento/descongelamento. Após esse tratamento, os extratos foram centrifugados a aproximadamente 10000g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante removido e armazenado em freezer a -25 °C até sua utilização nos testes.

3.2.4 Testes de toxicidade com *Artemia* sp.

Para a execução dos testes de toxicidade foram eclodidos cistos de *Artemia* sp. (Prime Artemia Incorporated - Utah, USA) em laboratório. Os cistos foram colocados em frascos erlenmeyer com 100 ml de meio de cultivo (água do mar reconstituída em salinidade 33), conforme modelo proposto por Harwig & Scott (1971). Esses frascos foram mantidos por 24 horas em câmara incubadora tipo DBO a temperatura de 25 ± 1 °C,

luminosidade constante e sem aeração. Após esse período, os náuplios eclodidos foram transferidos para outro erlenmeyer com 100 ml de meio de cultura, onde permaneceram por mais 24 horas para aclimação. Estes organismos (náuplios de *Artemia* sp. 24 horas após sua eclosão) foram utilizados nos testes de toxicidade.

Nos testes, os náuplios foram expostos a oito concentrações crescentes de *M. aeruginosa* diluídas com um fator de diluição 0,5, a partir do extrato-mãe. Assim, os organismos foram expostos às seguintes concentrações: 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,50, 25,00 e 50,00 mg·ml⁻¹ de peso seco. Paralelamente aos testes realizou-se um controle, a fim de observar-se as condições de teste para os organismos expostos.

Todos os testes foram feitos em placas de poliestireno (96 poços-teste de 300 µl cada) previamente lavadas abundantemente em água corrente, água destilada e água destilada e deionizada. Em cada poço-teste foram colocados em média 18 indivíduos (N = 216). Os testes dos cultivos salinos foram realizados com três réplicas para cada concentração de exposição dos organismos, enquanto o controle foi feito com 24 réplicas. O tempo de duração dos testes foi de 18 horas, depois das quais fez-se a contagem dos indivíduos mortos sob microscópio estereoscópico. Como critério de mortalidade usou-se a imobilidade dos náuplios durante aproximadamente 10 segundos. Após essa primeira contagem, todos os indivíduos foram mortos pela adição de 100 µl de fenol 5% (v/v) em cada poço-teste, sendo feita a contagem do total de organismos em cada réplica. A partir dos resultados foram calculadas as CL₅₀-18h de cada amostra, através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Os valores de CL₅₀-18h foram expressos em miligramas de peso algáceo seco por mililitro de solução (mg·ml⁻¹ p. s.).

3.2.5 Quantificação de proteínas nos cultivos salinos

No material liofilizado dos cultivos havia biomassa seca de *M. aeruginosa* e diferentes quantidades de sal. Assim, a verdadeira CL₅₀-18h provocada pelas toxinas presentes na biomassa da cianobactéria ficou mascarada pelo peso do sal no material liofilizado. A fim de eliminar a influência do sal no cálculo das CL₅₀-18h do material seco determinou-se seu teor de proteínas. Esta quantificação foi feita através de um método microquantitativo, descrito por Bradford (1976). As amostras foram analisadas em triplicata, utilizando-se sua média aritmética para calcular as CL₅₀-18h em termos de

proteína. Os valores de CL_{50-18h} foram então expressos em microgramas de proteínas por mililitro de solução ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.).

3.3 RESULTADOS

Os controles dos testes resultaram em 1,35% e 2,19% de mortes, respectivamente para o primeiro e o segundo experimentos (Tabela 3.1). Tais valores, que encontram-se abaixo dos 10%, evidenciam as boas condições dos testes, tornando-os válidos (Salomon, 1996).

Tabela 3.1 – Resultados dos controles dos testes de toxicidade com as amostras salinas. Mortalidade em cada uma das baterias de teste (experimentos I e II).

	CONTROLE (% DE MORTOS)
EXPERIMENTO I	1,35
EXPERIMENTO II	2,19

Analisando-se as CL_{50-18h} dos cultivos de salinidade 0 em cada experimento, percebe-se claramente uma considerável diferença entre a toxicidade dos mesmos: $16,49 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ p. s. e $6,04 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ p. s. nos experimentos I e II, respectivamente, indicando uma diferença superior a 100% entre eles. Já a tendência dos testes é a mesma, indicando uma gradativa diminuição da toxicidade de *M. aeruginosa* com o aumento da salinidade nos meios de cultivo (Figura 3.1).

Com a eliminação da interferência do sal presente nos cultivos através da determinação de proteínas, calculou-se as CL_{50-18h} das amostras em termos protéicos. Feita a correção, a toxicidade de *M. aeruginosa* apresentou novas e coincidentes tendências em ambos os testes (Figura 3.2). No experimento I, a cianobactéria apresentou uma maior toxicidade na salinidade 0,5 ($CL_{50-18h} = 16,44 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.), contra valores de $30,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot. e $28,72 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot. nas salinidades 0 e 1,0, respectivamente. Já no experimento II, a toxicidade foi maior nas salinidades 0,25 ($CL_{50-18h} = 13,03 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.) e 1,3 ($CL_{50-18h} = 15,79 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.). Em contrapartida, a amostra do cultivo em salinidade 1,7 ($CL_{50-18h} = 32,52 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.) foi consideravelmente menos tóxica que a amostra do cultivo em salinidade 0 ($CL_{50-18h} = 21,14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prot.).

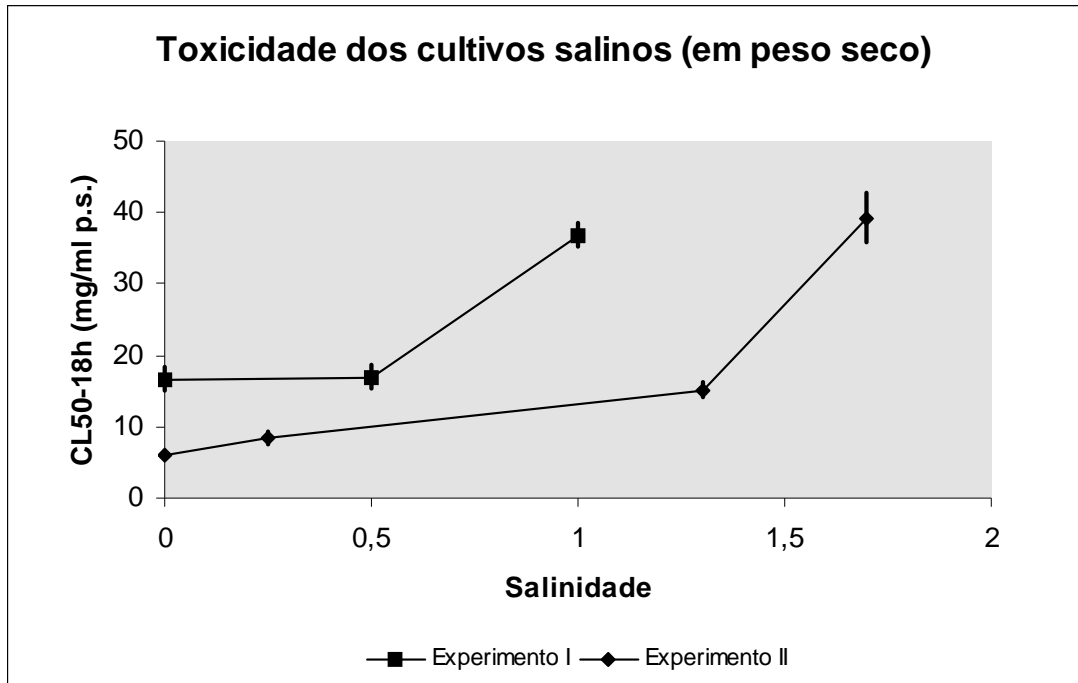


Figura 3.1 – Variação da toxicidade (em peso seco) de *M. aeruginosa* em relação à salinidade do meio de cultivo. As barras representam o intervalo de confiança (95%) em torno da média, fornecido pelo programa Trimmed Spearman-Kärber.

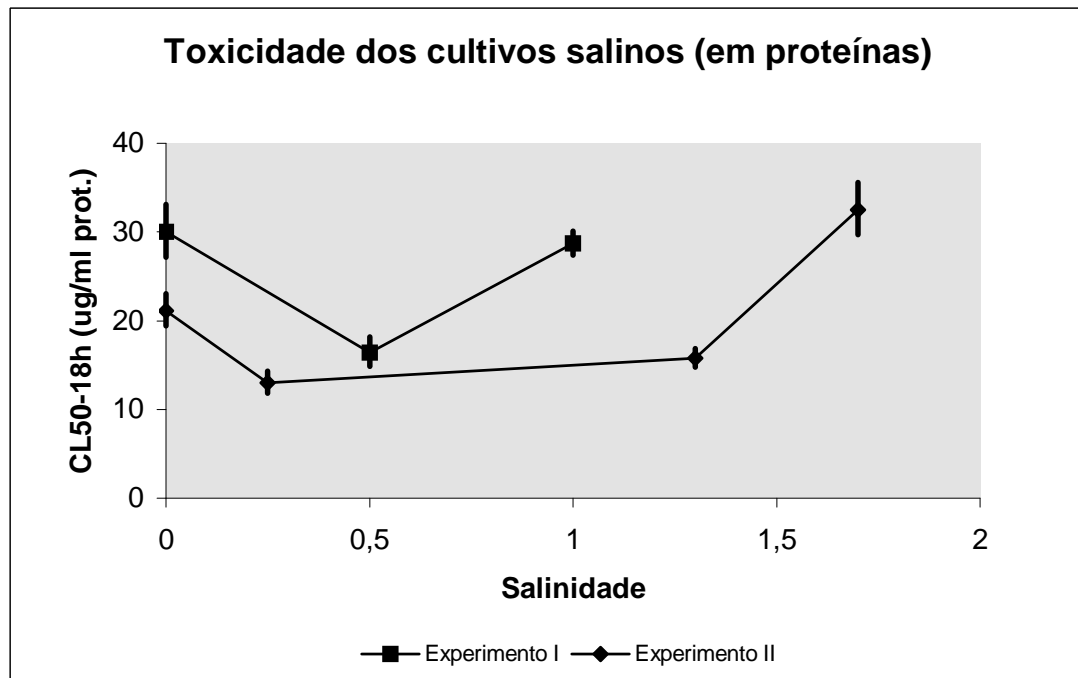


Figura 3.2 – Variação da toxicidade de *M. aeruginosa* em relação à salinidade do meio de cultivo, dada pelas CL₅₀-18h dos testes com *Artemia* sp. normalizados pelo teor de proteínas. As barras representam o intervalo de confiança (95%).

3.4 DISCUSSÃO

Testes de toxicidade com *Artemia* sp. apresentam boa correlação entre a quantidade de microcistinas e a mortalidade dos organismos expostos (Campbell et al., 1994). Além disso são de baixo custo e relativamente fáceis de proceder (Lawton et al., 1994). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram a literatura internacional demonstrando que o uso de *Artemia* sp. também é viável para testes de amostras salinas de florações, visto que o gênero *Artemia* sp. é capaz de viver em ambientes com salinidade até 300. Testes como os apresentados neste trabalho não poderiam ser feitos com camundongos, por exemplo, visto que o sal das amostras tornar-se-ia um agente tóxico, juntamente com as toxinas de *M. aeruginosa*.

De acordo com a classificação proposta por Lawton et al. (1994), as amostras dos cultivos em salinidade 0 apresentaram toxicidades baixa ($CL_{50-18h} = 16,49 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ p. s.) e média ($CL_{50-18h} = 6,04 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ p. s.), respectivamente para os experimentos I e II. Pelo fato de mostrarem-se bastante diferentes, em termos de toxicidade, ambos devem ser interpretados separadamente. Conforme correção apresentada nos resultados deste trabalho (item 3.3), a variação das CL_{50-18h} serão analisadas em termos de proteínas, a fim de eliminar o peso do sal nas amostras liofilizadas (peso seco).

No intuito de normalizar os resultados dos dois experimentos, transformou-se cada valor de CL_{50-18h} em termos percentuais da CL_{50-18h} na salinidade 0 de seu experimento. Os resultados dessa transformação foram plotados na Figura 3.3, que representa a variação da CL_{50-18h} em relação à salinidade. Os dois parâmetros apresentam uma correlação negativa ($r = 0,84$), ou seja, a toxicidade de *M. aeruginosa* diminui com o aumento da salinidade. Em meio com salinidade 1,7, sua toxicidade chega a ser 1,5 vezes menor do que em salinidade 0. Mas, ainda, é importante ressaltar que *M. aeruginosa* é mais tóxica nas primeiras salinidades do que na própria salinidade 0.

Fistarol (1997) encontrou boa tolerância de *M. aeruginosa* para crescimentos em baixa salinidade (0,25 e 0,5), que apresentaram taxas de crescimento similares às observadas em salinidade 0. Já em salinidades superiores, a capacidade de tolerância ao sal dessa cianobactéria é cada vez menor. Desta maneira percebe-se que pequenas quantidades de sal (inferiores a $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) não influenciam consideravelmente o crescimento de *M. aeruginosa*, porém ocasionam alguma modificação em seu metabolismo que estimula a produção de toxinas.

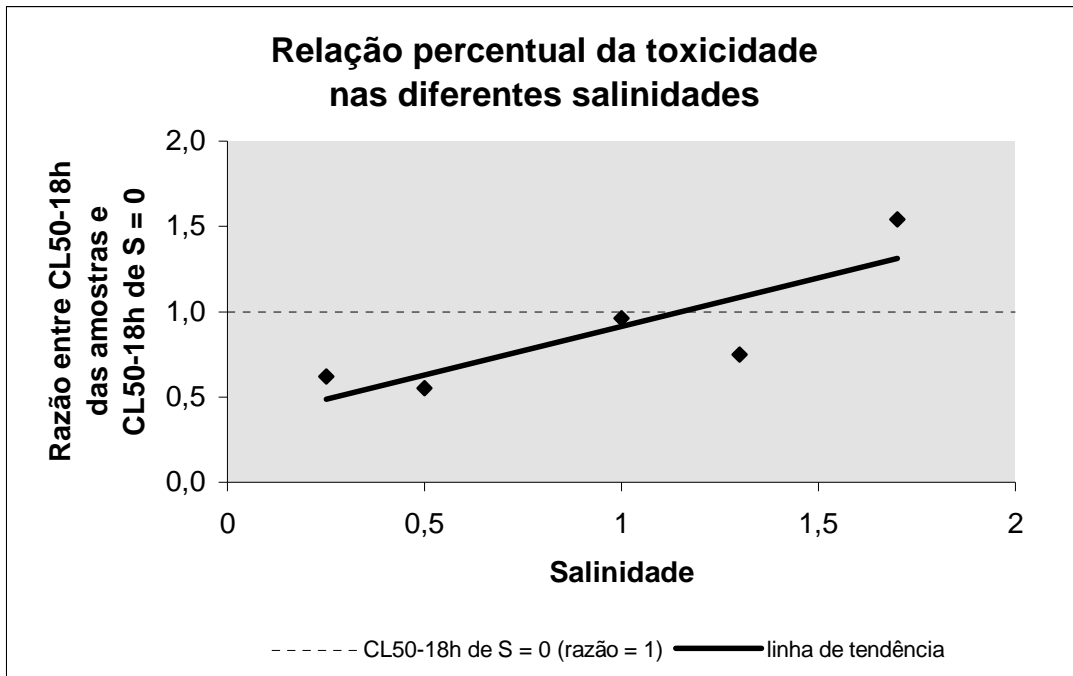


Figura 3.3 – Variação da toxicidade de *M. aeruginosa* em relação à salinidade do meio de cultivo. Normalização de dados dos dois experimentos: razão entre CL₅₀-18h das amostras e CL₅₀-18h do cultivo em salinidade 0, de cada experimento.

4 TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* SOBRE JUVENIS DO CAMARÃO ROSA *Farfantepenaeus paulensis*

4.1 INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse mundial em estudos sobre a importância das florações de algas tóxicas e seus impactos na aquicultura (Rensel, 1995). Na região estuarina da Lagoa dos Patos ocorre o desenvolvimento de juvenis de *Farfantepenaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea: Decapoda), também conhecido como camarão rosa. Esta espécie é economicamente importante para a pesca artesanal da região, principalmente nos meses de verão, sendo também cultivada experimentalmente em gaiolas e cercados nas enseadas rasas (Figura 4.1).



Figura 4.1 – Cultivos experimentais do camarão rosa *F. paulensis* em enseadas rasas na Ilha da Torotama (estuário da Lagoa dos Patos). Cultivos feitos em cercado pela Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da FURG.

Nesse mesmo estuário, florações da cianobactéria *M. aeruginosa* têm sido observadas nos meses de verão e início de outono provenientes de regiões à montante da Lagoa dos Patos. Tais cianobactérias são produtoras de toxinas (microcistinas), e têm sido

largamente reportadas na literatura mundial devido a eventos de intoxicação e morte de animais (Carmichael,1995).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Cultivo de *M. aeruginosa* em laboratório

O material algáceo utilizado nos testes de toxicidade foi obtido a partir de cultivos massivos em laboratório da cepa *Microcystis aeruginosa* RST9501, isolada do estuário da Lagoa dos Patos. Tais cultivos foram feitos em meio BG11 com 8,8 mM de NaNO₃ (modificado de Rippka et al., 1979), e mantidos em câmara incubadora tipo DBO sob condições controladas (temperatura de 25 ± 1 °C, luminosidade de aproximadamente 16 µE·m⁻²·s⁻¹ e pH 8,0).

4.2.2 Processamento do material algáceo dos cultivos

Terminados os cultivos, todo o material foi armazenado em freezer a -25 °C. Conforme a disponibilidade ele foi preparado para liofilização (Micromodulyo – Edwards) a -30 °C, sendo o material seco acondicionado novamente em freezer até a sua utilização nos testes de toxicidade.

4.2.3 Obtenção dos juvenis de *F. paulensis*

A geração parental (matrizes) dos organismos usados no teste de toxicidade é oriunda da população adulta de *F. paulensis* que vive em Santa Catarina. A reprodução em cativeiro foi realizada na EMA-FURG, através de indução a maturação e desova das matrizes. As larvas eclodidas foram cultivadas em tanques até atingirem a fase juvenil, quando foram feitos os testes de toxicidade.

4.2.4 Preparo dos extratos de *M. aeruginosa* para os testes de toxicidade

O material liofilizado de *M. aeruginosa* foi diluído em água do mar filtrada (conforme procedimento adotado na EMA-FURG), resultando na concentração de 100

mg·ml⁻¹. A fim de promover o rompimento das células e consequente liberação das toxinas na água, esse extrato aquoso foi submetido a três sonificações (High Intensity Ultrasonic Processor, 50 Watt Model, 20 kHz) de três minutos cada, a baixa temperatura (inferior a 10 °C), intercaladas com ciclos de congelamento/descongelamento. Após isso, o extrato foi centrifugado a aproximadamente 3500g durante 10 minutos para precipitação das células rompidas. O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer a -25 °C até sua utilização nos testes.

4.2.5 Testes de toxicidade

No intuito de precisar a toxicidade de *M. aeruginosa* cultivada realizou-se um teste padrão com *Artemia* sp., conforme descrito em Yunes et al. (1996) e nos capítulos 2 e 3 deste trabalho.

O teste de toxicidade com juvenis de *F. paulensis* foi realizado nas mesmas condições de cultivo (temperatura 24-26 °C, salinidade 25, fotoperíodo natural) em que os organismos são criados na EMA-FURG. O tempo de duração do teste foi 24 horas, sendo feito com aeração constante, sem alimentação e utilizando organismos com comprimento total médio de 3,76 cm (intervalo de confiança 95%: 3,56-3,93), segundo relações biométricas encontradas por D'Incao & Calazans (1978).

Os testes foram feitos em frascos erlenmeyer (250 ml). Estes possuem a boca estreita, o que diminui a probabilidade de fuga dos animais, que costumam dar saltos. No teste, os organismos foram expostos a concentrações de 1,5, 2,0, 2,5 e 3,5 mg·ml⁻¹, além do controle com água do mar. Um total de quinze indivíduos foram expostos em cada concentração, divididos em cinco réplicas com três organismos cada. Terminado o período de duração do teste procedeu-se a contagem dos mortos. As CL₅₀ dos testes (*Artemia* sp. e *F. paulensis*) foram calculadas através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977), com os valores expressos em miligramas de peso algáceo seco por mililitro de solução (mg·ml⁻¹ p. s.).

4.3 RESULTADOS

O teste de toxicidade padrão, com *Artemia* sp., apresentou um controle com 3,08% de indivíduos mortos (Tabela 4.1). Tal porcentagem pode ser considerada normal,

validando o teste (Salomon, 1996). A CL_{50} -18h para *Artemia* sp. foi de 4,73 $mg \cdot ml^{-1}$ (Tabela 4.2). Assim, essa amostra de *M. aeruginosa* é considerada de média toxicidade, conforme classificação proposta por Lawton et al. (1994).

Tabela 4.1 – Resultados do teste de toxicidade com *Artemia* sp. para o extrato de *M. aeruginosa*.

CONCENTRAÇÃO DE EXPOSIÇÃO ($mg \cdot ml^{-1}$)	ORGANISMOS EXPOSTOS	ORGANISMOS MORTOS	ORGANISMOS MORTOS (%)
Controle	427	12	3,08
0,39	60	1	1,67
0,78	54	0	0,00
1,56	54	3	4,88
3,13	41	8	18,47
6,25	40	26	64,62
12,50	45	45	100,00
25,00	49	49	100,00
50,00	45	45	100,00

Tabela 4.2 – Toxicidade do extrato de *Microcystis aeruginosa* para *Artemia* sp. e juvenis de *Farfantepenaeus paulensis*. Valores de CL_{50} e respectivos intervalos de confiança (95%). A abreviatura “n. c.” representa um valor não calculável pelo programa Trimmed Spearman Karber.

ORGANISMO-TESTE	CL_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$)	INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)
<i>Artemia</i> sp.	4,73 (18h)	4,30-5,20
<i>F. paulensis</i>	2,96 (24h)	n. c.

O teste de toxicidade com juvenis de *F. paulensis* também apresentou um bom resultado no controle. A mortalidade de 13,33% (dois organismos) (Tabela 4.3) pode ser considerada normal, visto que o teste foi procedido sem alimentação e os organismos mortos encontravam-se sem os apêndices do cefalotórax e do abdome, tendo sido, provavelmente, vítimas de canibalismo durante um período de muda (fato normal entre juvenis dessa espécie). Já os organismos mortos nas demais concentrações não apresentavam tais características. A CL_{50} -24h do teste resultou em um valor de 2,96 $mg \cdot ml^{-1}$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.3 – Resultados do teste de toxicidade com *F. paulensis* para o extrato de *M. aeruginosa*.

CONCENTRAÇÃO DE EXPOSIÇÃO (mg·ml ⁻¹)	ORGANISMOS EXPOSTOS	ORGANISMOS MORTOS	ORGANISMOS MORTOS (%)
Controle	15	2	13,33
1,5	14	1	7,14
2,0	14	2	14,29
2,5	15	2	13,33
3,5	15	15	100,00

4.4 DISCUSSÃO

A cianobactéria *M. aeruginosa* mostrou-se tóxica aos juvenis do camarão rosa *F. paulensis*, apresentando uma CL₅₀-24h de 2,96 mg·ml⁻¹. Enquanto isso, para *Artemia* sp. a CL₅₀-18h foi de 4,73 mg·ml⁻¹ (Tabela 4.2), o que evidencia a média toxicidade da amostra segundo proposta de Lawton et al. (1994).

DeMott et al. (1991) encontraram valores de CL₅₀-48h (para microcistina-LR) de 9,6, 11,6 e 21,4 µg·ml⁻¹ para *Daphnia pulex*, *Daphnia hyalina* e *Daphnia pulicaria*, respectivamente. Já para o copépodo *Diatomus birgei*, os mesmos autores encontraram uma CL₅₀-48h de 0,45 µg·ml⁻¹, o que evidencia uma grande variabilidade na sensibilidade de microcrustáceos do mesmo gênero e entre grupos diferentes, em relação à microcistina-LR. Salomon (1996) testou a toxicidade da toxina microcistina-LR em juvenis de *F. paulensis* (de geração parental também proveniente do litoral de Santa Catarina) encontrando uma CL₅₀-48h de 2,25 µg·ml⁻¹, o que evidencia a sensibilidade dessa espécie à toxina produzida por *M. aeruginosa*. Apesar do baixo valor, de acordo com proposta de Christoffersen (1996), *F. paulensis* se enquadraria entre as espécies aquáticas mais tolerantes à ação das microcistinas (0,5-20,0 µg·ml⁻¹ toxina). O mesmo autor também encontrou uma forte correlação (r = 0,90) entre biomassa de um organismo e sua sensibilidade à toxina. Ecologicamente esse fato pode ser relevante, demonstrando que as microcistinas são bastante potentes. Mas em termos de aquicultura essa proposta não pode ser levada em consideração, pois níveis de toxicidade semelhantes à CL₅₀ encontrada no teste podem ser alcançados durante as florações.

Na literatura internacional há alguns registros de efeitos de cianobactérias tóxicas sobre organismos cultivados em aquicultura. Bury et al. (1996) observaram que a

truta marrom (*Salmo trutta*) responde fisiologicamente à presença de células rompidas de *M. aeruginosa*, apresentando sinais evidentes de estresse. Já Beveridge et al. (1993) encontraram que a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) podem diferenciar células de cepas tóxicas e não tóxicas de *M. aeruginosa*, quando essas são oferecidas como alimento. Corroborando esses estudos, Tencalla et al. (1994) e Rodger et al. (1994) associam mortalidades de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e truta marrom (*Salmo trutta*), respectivamente, à ingestão de cianobactérias hepatotóxicas. Da mesma maneira, Lightner (1978) associa grandes mortalidades de camarão azul (*Penaeus stylirostris*) à ingestão da cianobactéria *Spirulina subsalsa*, presente em tanques de cultivo no México.

O presente estudo evidenciou a toxicidade aguda de *M. aeruginosa* ao camarão rosa (*F. paulensis*). Os testes foram feitos sem alimentação, demonstrando que as brânquias também funcionam como uma via de entrada de toxinas no organismo de espécies cultivadas na aquacultura. Os estudos anteriores abordam o trato digestivo como via de entrada de toxinas no organismo. Comparando as duas formas de assimilação, realmente via alimentação um indivíduo pode absorver maiores quantidades de toxina do que via respiração, considerando um mesmo intervalo de tempo. Significativas quantidades de toxinas podem se adsorver no alimento, passando através do epitélio intestinal e atuando a nível hepático. Enquanto isso, via respiração as toxinas passam diretamente da água para o sistema circulatório através de difusão, no epitélio branquial. Esse fato evidencia que, mesmo em períodos de jejum, os juvenis do camarão rosa *F. paulensis* estão absorvendo as toxinas de *M. aeruginosa* presentes na água.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado na discussão dos resultados deste trabalho pode-se fazer as seguintes considerações:

- Florações tóxicas de *M. aeruginosa* têm sido observadas nos últimos cinco anos no estuário da Lagoa dos Patos. Tais florações, de uma maneira geral, têm apresentado média a alta toxicidade. Até o momento ainda não foi registrado nenhum caso de intoxicação de animais ou outros problemas envolvendo populações humanas da região. Mas as águas do estuário estão sendo constantemente usadas para fins de recreação e de pesca artesanal. Por estes motivos deve-se redobrar a atenção em relação ao risco oferecido pelas florações de *M. aeruginosa*, a fim de se evitar futuros problemas.
- O estuário da Lagoa dos Patos possui grandes dimensões (dezenas de milhas náuticas em seu eixo principal). Em determinados períodos, suaves gradientes de salinidade podem ser encontrados em suas águas superficiais, indicando situações de homogeneidade halina. Em testes de toxicidade, *M. aeruginosa* mostrou-se mais tóxica em pequenas salinidades (até 1,3) em seu meio de cultivo. Assim, florações de *M. aeruginosa* que venham a se desenvolver no estuário em tais situações (por exemplo, na região da Feitoria – limite interior do estuário) podem ser mais tóxicas do que aquelas que se desenvolvem no corpo central da Lagoa e atingem o estuário em situações de vazante.
- A toxicidade de *M. aeruginosa* sobre juvenis de *F. paulensis* (conforme resultados encontrados neste trabalho) não corresponde a um risco direto dos organismos no ambiente, pois no meio eles provavelmente teriam uma resposta comportamental de fuga ou de enterramento, no caso de um eventual encontro. Além disso, as florações se desenvolvem principalmente na superfície, enquanto os juvenis do camarão possuem hábitos demersais. Por outro lado, esses resultados servem de alerta ao risco tóxico que as florações de *M. aeruginosa* podem oferecer aos cultivos de camarão rosa em ambiente natural, como os que estão começando a ocorrer no estuário da Lagoa dos Patos. As florações de *M. aeruginosa* ocorrem durante o verão e início de outono, coincidindo com o período de desenvolvimento dos juvenis de *F. paulensis* no estuário. Dependendo do regime de ventos as florações podem se acumular nas margens das enseadas rasas, oferecendo perigo aos cultivos. Principalmente àqueles em estruturas

de gaiola flutuante (Figura 5.1), onde os organismos são cultivados próximo à superfície e não têm acesso a um substrato que permita seu enterramento.



Figura 5.1 – Cultivos experimentais do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* em enseadas rasas no estuário da Lagoa dos Patos. Cultivos feitos em gaiolas flutuantes pela Estação Marinha de Aquacultura (EMA) da FURG.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. T. A.; BAUMGARTEN, M. G. Z.; RODRIGUES, R. M. O. 1993. **Identificação das possíveis fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade do Rio Grande, RS.** Ed. FURG, série Documentos Técnicos – Oceanografia, 6, 36p.
- ASMUS, M. L. 1997. Coastal plain and Patos Lagoon. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CATELLO, J. P. (Eds.). **Subtropical convergence environments: the coast and sea in the Southwestern Atlantic.** Springer-Verlag, pp. 9-12.
- BERG, K.; SKULBERG, O. M.; SKULBERG, R. 1987. Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality – a laboratory study. **Arch. Hydrobiol.**, 108(4): 549-563.
- BEVERIDGE, M. C. M.; BAIRD, D. J.; RAHMATULLAH, S. M.; LAWTON, L. A.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A. 1993. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, 43: 901-907.
- BONILHA, L. E.; ASMUS, M. L. 1994. Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Publ. Acad. Ciências Est. (S. Paulo)**, 87(1): 347-362.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- BURY, N. R.; EDDY, F. B.; CODD, G. A. 1996. Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 11: 187-193.
- CALLIARI, L. J. 1980. **Aspectos sedimentológicos e ambientais da região sul da Lagoa dos Patos.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 190p. (Dissertação de Mestrado).
- CAMPBELL, D. L.; LAWTON, L. A.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A. 1994. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 9: 71-77.

- CARDELLINA, J. H.; MARNER, F. J.; MOORE, R. E. 1979. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. **Science**, 204: 193-195.
- CARMICHAEL, W. W. 1995. Cyanobacterial toxins. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds.). **Manual on harmful marine microalgae**. IOC Manuals and Guides n° 33, UNESCO, pp. 463-474.
- CARMICHAEL, W. W.; FALCONER, I. R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**. Academic Press Ltd., Cambridge, pp. 187-209.
- CHRISTOFFERSEN, K. 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. **Phycologia**, 35(6): 42-50.
- CODD, G. A. 1998. Cyanobacterial blooms and toxins in fresh-, brackish and marine waters. In: REGUERA, B.; BLANCO, J.; FERNÁNDEZ, M. L.; WYATT, T. (Eds.). **Harmful algae**. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 13-17.
- DEMOTT, W. R.; ZHANG, Q.-X.; CARMICHAEL, W. W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. **Limnol. Oceanogr.**, 36(7): 1346-1357.
- D'INCAO, F. 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. **Atlântica**, 13(1): 159-169.
- D'INCAO, F. 1995. **Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos dendrobranchiata (Crustacea: Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental**. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 365p. (Tese de Doutorado).
- D'INCAO, F.; CALAZANS, D. F. 1978. Relações biométricas do “camarão rosa” *Penaeus paulensis* Perez Farfante, 1967, na Lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica**, 3: 57-66.
- FALCONER, I. R. 1993. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**, Academic Press Ltd., Cambridge, pp. 177-186.
- FAY, P. 1983. **The blue-greens**. Studies in Biology n° 160, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, UK, 88p.
- FERRAZ, M. L. C. P. 1997. **Cultivo experimental do camarão rosa *Penaeus paulensis* em cercado na Ilha da Torotama: a comunidade, a legislação e o cultivo**. Fundação Universidade do Rio Grande, Brasil, 58p. (Monografia de Graduação).

- FISTAROL, G. O. 1997. **Efeito da salinidade sobre o crescimento de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* isolada do estuário da Lagoa dos Patos.** Fundação Universidade do Rio Grande, Brasil, 44p. (Monografia de Graduação).
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, 11(7): 714-719. Correction 12(4): 417 (1978).
- HARWIG, J.; SCOTT, P. M. 1971. Brine-shrimp (*Artemia salina*) larvae as screening systems for fungal toxins. **Appl. Microbiol.**, 21: 1011-1016.
- IWAI, M. 1978. **Desenvolvimento larval e pós-larval de *Penaeus (Melicertus) paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda) e o ciclo de vida dos camarões do gênero *Penaeus* da região centro-sul do Brasil.** Universidade de São Paulo, Brasil, 138p. (Tese de Doutorado).
- KJERFVE, B. 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons. In: Wolfe, D. A. (Ed.). **Estuarine variability.** Academic Press Ltd., New York, pp. 63-81.
- KONONEN, K.; SELLNER, K. G. 1995. Toxic cyanobacteria blooms in marine, estuarine and coastal ecosystems. In: LASSUS, P.; ARZUL, G.; ERARD, E.; GENTIEN, P.; MARCAILLOU, C. (Eds.). **Harmful Marine Algal Blooms.** Lavoisier, Intercept Ltd., pp. 858-860.
- LAWTON, L. A.; BEATTIE, K. A.; HAWSER, S. P.; CAMPBELL, D. L.; CODD, G. A. 1994. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: CODD, G. A.; JEFFERIES, T. M.; KEEVIL, C. W.; POTTER, E. (Eds.). **Detection methods for cyanobacterial toxins.** The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 111-116.
- LIGHTNER, D. V. 1978. Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 32: 139-150.
- MARCHIORI, M. A. 1996. **Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão-rosa *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967.** Ed. FURG, Rio Grande, Brasil, 79p.
- MATTHIENSEN, A. 1996. **Ocorrência, distribuição e toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (Kütz. emend. Elenkin) no estuário da Lagoa dos Patos.** Fundação Universidade do Rio Grande, Brasil, 117p. (Dissertação de Mestrado).
- MÖLLER Jr., O. O.; PAIM, P. S. G.; SOARES, I. D. 1991. Facteurs e mecanismes de la circulation des eaux dans l'estuaire de la Lagune dos Patos (RS – Brésil). **Bull. Inst. Géol. Bassin d'Aquitaine**, 49: 15-21.

- MYNDERSE, J. S.; MOORE, R. E.; KASHIWAKI, M.; NORTON, T. R. 1977. Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. **Science**, 196: 538-540.
- ODEBRECHT, C.; SEELIGER, U.; COUTINHO, R.; TORGAN, L. C. 1987. Florações de *Microcystis* (cianobactérias) na Lagoa dos Patos, RS. **Simpósio sobre ecossistemas da costa Sul e Sudeste brasileira: síntese dos conhecimentos**, Cananéia, Brasil, pp. 280-287 (Anais).
- PARK, H.-D.; IWAMI, C.; WATANABE, M. F.; HARADA, K.-I.; OKINO, T.; HAYASHI, H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 13: 61-72.
- PEARSON, M. J. 1990. **Toxic blue-green algae**. The report of the National Rivers Authority (NRA), Water Quality series n° 2, 128p.
- POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, 352: 21-26.
- RAPALA, J. 1998. **Toxin production by freshwater cyanobacteria: effects of environmental factors**. University of Helsinki, Finland, 63p. (PhD. Thesis).
- RENSEL, J. E. 1995. Management of finfish aquaculture resources. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds.). **Manual on harmful marine microalgae**. IOC Manuals and Guides n° 33, UNESCO, pp. 463-474.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, 111 : 1-61.
- RODGER, H. D.; TURNBULL, T.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. **Journal of Fish Diseases**, 17: 177-181.
- SALOMON, P. S. 1996. **Determinação do potencial tóxico de florações de *Microcystis aeruginosa* (cianobactéria) da Lagoa dos Patos, estuário e praia do Cassino**. Fundação Universidade do Rio Grande, Brasil, 82p. (Monografia de Graduação).
- SIVONEN, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, 35(6): 12-24.

- SKULBERG, O. M.; CARMICHAEL, W. W.; CODD, G. A.; SKULBERG, R. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**. Academic Press Ltd., Cambridge, pp. 145-164.
- TENCALLA, F. G.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 30: 215-224.
- TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M. F.; HARADA, K. I.; ITO, E.; WATANABE, M. 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, 32: 833-843.
- TORGAN, L. C. 1989. Floração de algas: composição, causas e consequências. **Ínsula**, 19: 15-34.
- TORGAN, L. C. 1997. **Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil, em um ciclo anual**. Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 284p. (Tese de Doutorado).
- VALENTINI, H.; D'INCAO, F.; RODRIGUES, L. F.; REBELO NETO, J. E.; RAHN, E. 1991. Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil. **Atlântica**, 13(1): 143-157.
- YUNES, J. S.; NIENCHESKI, L. F. H.; SALOMON, P. S.; PARISE, M.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT, S. L.; CODD, G. A. 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, 5: 223-229.
- YUNES, J. S.; NIENCHESKI, L. F. H.; SALOMON, P. S.; PARISE, M.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT, S. L.; CODD, G. A. 1998a. Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, 26: 1796-1800.
- YUNES, J. S.; MATTHIENSEN, A.; PARISE, M.; SALOMON, P. S.; RAGGETT, S. L.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A. 1998b. *Microcystis aeruginosa* growth stages and the occurrence of microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. In: REGUERA, B.; BLANCO, J.; FERNÁNDEZ, M. L.; WYATT, T. (Eds.). **Harmful algae**. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 18-21.

ANEXOS

ANEXO 1

PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

BATERIA DE TESTE I

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
1	22	0	23	1	22
0	24	1	23	1	18
0	22	0	19	1	21
2	24	1	23	1	18
0	14	0	12	1	17
2	19	3	21	1	20
0	20	1	18	0	19
0	25	1	15	1	23

AMOSTRA 1 – FEITORIA (07/01/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	16	0	13	4	16
0,78	13	21	7	15	11	17
1,56	22	22	13	13	18	20
3,13	22	22	18	18	17	17
6,25	18	18	14	14	11	11
12,50	16	16	15	15	13	13
25,00	10	10	20	20	14	14
50,00	10	10	19	19	18	18

BATERIA DE TESTE II

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0	18	1	22	1	18
1	23	1	15	0	16
1	18	0	15	0	12
0	16	0	23	0	12
1	17	0	16	0	16
1	13	3	15	0	11
2	23	0	13	0	14
0	17	0	21	0	12

AMOSTRA 3 – BÓIA DO CASCO SOÇOBRA DO (08/01/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	2	11	6	13	5	13
0,78	5	15	5	16	6	15
1,56	4	11	7	15	10	23
3,13	4	11	7	13	6	10
6,25	13	18	12	14	20	23
12,50	17	17	13	14	17	18
25,00	22	22	15	15	13	13
50,00	18	18	16	16	16	16

AMOSTRA 7 – MARAMBAIA (16/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	2	12	4	14	3	10
0,78	7	14	3	9	7	12
1,56	1	16	4	20	3	13
3,13	4	11	5	8	5	16
6,25	11	12	6	9	8	9
12,50	19	19	18	18	22	22
25,00	21	21	15	15	13	13
50,00	17	17	14	14	11	11

AMOSTRA 8 – SÃO GONÇALO (16/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	7	23	5	13	8	16
0,78	8	14	6	19	8	15
1,56	18	23	23	26	13	20
3,13	11	11	18	18	15	15
6,25	18	18	14	14	20	20
12,50	15	15	14	14	20	20
25,00	11	11	13	13	18	18
50,00	17	17	20	20	12	12

BATERIA DE TESTE III

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
2	22	1	15	2	15
1	18	3	13	2	11
1	13	3	17	1	10
1	13	1	15	0	13
1	16	0	10	1	11
0	15	1	10	1	15
0	16	2	18	3	19
1	14	1	14	1	11

AMOSTRA 9 – FAROLETE (30/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	5	27	3	20	1	23
0,78	3	15	3	16	3	13
1,56	7	18	7	18	10	17
3,13	20	24	16	16	17	18
6,25	16	16	16	16	23	24
12,50	15	15	15	15	22	22
25,00	15	15	14	14	20	20
50,00	24	24	25	25	21	21

AMOSTRA 10 – FEITORIA (30/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	15	4	13	1	17
0,78	2	16	3	19	0	17
1,56	5	16	6	18	3	18
3,13	12	14	12	16	8	9
6,25	15	15	16	16	18	18
12,50	21	21	16	16	17	17
25,00	13	13	20	20	16	16
50,00	14	14	16	16	13	13

AMOSTRA 11 – MARAMBAIA (30/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	2	20	0	16	3	22
0,78	0	10	3	16	3	20
1,56	1	18	3	12	1	16
3,13	7	15	10	20	10	16
6,25	15	15	21	24	13	13
12,50	20	20	22	22	13	13
25,00	12	12	15	15	19	19
50,00	20	20	12	12	11	11

AMOSTRA 12 – SÃO GONÇALO (30/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	24	0	14	0	15
0,78	0	14	2	18	2	14
1,56	5	17	9	12	7	21
3,13	16	18	12	13	15	15
6,25	15	15	21	21	19	19
12,50	13	13	16	16	16	16
25,00	20	20	23	23	24	24
50,00	27	27	18	18	15	15

BATERIA DE TESTE IV

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
2	8	0	15	2	24
3	27	0	9	2	9
2	18	5	28	1	8
0	29	1	21	4	18
3	83	2	27	3	23
2	96	2	25	1	11
1	44	0	19	1	15
4	39	6	38	1	5

AMOSTRA 2 – SÃO GONÇALO (07/01/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,20	4	31	1	13	3	12
0,39	1	24	1	12	3	28
0,78	4	30	0	19	7	20
1,56	1	16	1	22	0	20
3,13	3	21	5	15	1	18
6,25	14	21	15	26	9	25
12,50	16	17	16	18	18	20
25,00	18	18	16	16	12	12

AMOSTRA 4 – SACO DO MENDANHA (08/01/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,20	0	10	1	20	1	13
0,39	2	20	0	10	1	12
0,78	2	18	3	16	0	21
1,56	4	14	1	15	2	15
3,13	9	21	3	12	5	22
6,25	16	18	13	18	16	17
12,50	18	18	14	14	11	11
25,00	13	13	18	18	11	11

AMOSTRA 6 – FEITORIA (16/03/98)						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,20	1	16	1	16	1	18
0,39	0	14	2	19	2	15
0,78	2	19	2	14	2	10
1,56	0	16	4	11	0	16
3,13	6	15	7	9	12	14
6,25	22	22	11	11	19	20
12,50	13	13	14	14	14	14
25,00	9	9	9	9	19	19

BATERIA DE TESTE V

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
1	18	1	25	0	31
2	29	0	14	0	29
1	24	0	18	0	17
0	26	2	23	1	22
2	26	2	20	0	14
1	20	1	17	1	14
0	15	1	25	1	24
0	21	1	17	1	13

CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	AMOSTRA 5 – FAROLETE (16/03/98)					
	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,10	2	19	4	15	2	15
0,20	1	21	1	19	2	16
0,39	1	27	0	17	3	29
0,78	5	19	0	22	3	17
1,56	11	14	14	21	9	29
3,13	23	24	12	17	23	24
6,25	27	30	16	16	14	14
12,50	21	21	22	22	16	16

ANEXO 2

PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE DAS AMOSTRAS SALINAS

EXPERIMENTO I

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0	14	2	19	0	10
0	11	0	21	0	12
1	20	1	20	0	21
1	13	0	24	0	15
0	14	0	18	0	16
0	23	0	13	0	13
0	14	0	20	0	16
1	24	0	16	0	16

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 0						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	0	15	0	27	0	25
0,78	1	13	0	12	0	15
1,56	1	12	0	13	0	16
3,13	1	15	0	16	2	18
6,25	0	14	1	13	1	17
12,50	3	14	1	14	7	26
25,00	11	15	10	20	15	15
50,00	18	18	22	22	18	18

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 0,5						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	20	0	16	6	19
0,78	3	12	0	15	1	21
1,56	0	20	0	22	0	22
3,13	0	17	1	22	2	16
6,25	1	17	0	18	3	11
12,50	4	16	3	21	2	14
25,00	19	22	11	11	9	16
50,00	12	12	21	21	14	14

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 1,0						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	0	24	0	14	0	20
0,78	0	18	0	21	0	14
1,56	1	15	0	23	0	13
3,13	0	23	0	26	0	20
6,25	2	18	0	16	0	15
12,50	0	16	0	18	0	14
25,00	4	26	0	26	1	20
50,00	14	15	13	20	13	14

EXPERIMENTO II

CONTROLE					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
3	24	1	27	1	21
0	15	0	26	0	16
0	14	0	25	0	20
2	17	0	32	0	20
0	23	0	21	0	18
3	19	0	19	0	13
0	18	0	15	0	17
1	25	0	19	0	20

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 0						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	0	30	0	35	0	28
0,78	0	37	0	21	0	14
1,56	1	19	0	22	1	28
3,13	2	32	2	34	1	27
6,25	17	26	17	38	7	14
12,50	25	28	17	17	25	27
25,00	18	18	20	20	16	16
50,00	24	24	24	24	17	17

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 0,25						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	0	18	1	22	0	21
0,78	0	25	1	19	0	24
1,56	1	19	0	34	1	23
3,13	0	16	1	21	2	26
6,25	2	17	6	22	9	21
12,50	13	16	11	16	16	20
25,00	13	13	22	22	15	15
50,00	13	13	21	21	14	14

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 1,3						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	24	0	27	0	22
0,78	0	16	0	18	1	18
1,56	1	15	0	17	0	15
3,13	0	15	0	15	0	22
6,25	0	15	1	19	0	12
12,50	4	18	4	20	3	17
25,00	26	26	13	13	19	19
50,00	15	15	25	25	16	16

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – SALINIDADE 1,7						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	0	20	1	21	0	12
0,78	0	7	0	14	0	11
1,56	0	11	0	16	0	10
3,13	0	10	2	9	0	9
6,25	0	12	0	13	0	11
12,50	0	15	1	11	0	12
25,00	3	13	2	13	1	13
50,00	7	11	4	6	7	9

ANEXO 3

PLANILHAS DOS TESTES DE TOXICIDADE ENVOLVENDO O CAMARÃO ROSA

CONTROLE – <i>Artemia</i> sp.					
RÉPLICAS 1 A 8		RÉPLICAS 9 A 16		RÉPLICAS 17 A 24	
MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
1	21	0	22	0	21
0	26	1	19	1	16
1	19	0	11	0	15
0	29	0	20	1	24
0	14	1	11	1	19
0	15	1	16	1	20
1	12	0	17	0	11
0	19	1	19	1	11

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – teste com <i>Artemia</i> sp.						
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
0,39	1	20	0	24	0	16
0,78	0	20	0	12	0	22
1,56	0	14	1	18	2	22
3,13	3	17	1	9	4	15
6,25	8	12	7	13	11	15
12,50	16	16	13	13	16	16
25,00	13	13	15	15	21	21
50,00	11	11	19	19	15	15

<i>Microcystis aeruginosa</i> RST9501 – teste com <i>Farfantepenaeus paulensis</i>										
CONCENTRAÇÃO (mg·ml ⁻¹)	RÉPLICA I		RÉPLICA II		RÉPLICA III		RÉPLICA IV		RÉPLICA V	
	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL	MORTOS	TOTAL
controle	1	3	1	3	0	3	0	3	0	3
1,5	0	3	0	3	0	3	0	2	1	3
2,0	0	3	0	3	0	3	1	2	1	3
2,5	1	3	0	3	0	3	0	3	1	3
3,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3