

## Concentrações de Microcistinas e Toxicidade nas Formas Coloniais de *Microcystis Aeruginosa* de Florações no Estuário da Lagoa dos Patos, RS.

MINILLO, A.;<sup>1</sup> FERREIRA, A.H.F.,<sup>1</sup> YOGUI, G.T.<sup>2</sup> & YUNES, J.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS

<sup>2</sup> Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo

### ABSTRACT

Toxic blooms of cyanobacteria, especially of *Microcystis aeruginosa* have been registered in the Patos Lagoon estuarine waters during irregular periods in the last two decades. The aims of the present study are to analyse the intracellular toxin levels in blooms the of *Microcystis aeruginosa* in the Patos Lagoon estuary between April/1997 and July/1998, the concentrations in relationship the colonial forms and their toxicity. Surface water sample were collected monthly using a water pump and filtered through with a plankton net (55 µm). These samples were used for physical and chemical analysis of environmental and biological parameters in laboratory. Complementary samples were collected through towing a plankton net (55 µm), for evaluation of toxicity tests. The samples were concentrated, frozen and lyophilized at - 30 °C. With the dry biomass of *M. aeruginosa* toxins were dosed, and extracts were prepared for the toxicity tests, with duration of 18 hour, using brine-shrimp *Artemia* sp. The software Trimmed Spearman-Kärber was used for the calculation of the CL<sub>50</sub>-18h. The occurrence of cyanobacteria was only verified between the summer and autumn of 1998. *Microcystis aeruginosa* was the dominant species during the cyanobacteria blooms in the estuary. The largest density organism were observed between the months of March (1539. 10<sup>2</sup> colonies L<sup>-1</sup>) and April (4567. 10<sup>2</sup> colonies L<sup>-1</sup>) of 1998. During these events, maximum levels of intracellular microcystins in the cyanobacteria blooms were found, in the range of 265.10 µg L<sup>-1</sup>. The toxicity of the blooms presented values of CL<sub>50</sub> between 0.71 and 5.67 mg mL<sup>-1</sup> p.s. Some colonial forms of *M. aeruginosa*, as: IV, IVn, Va and VI, correlated with the largest quantified levels of intracellular microcystins, whereas some other forms IV, IVn and Va correlated to largest toxicity. About 60% of the test presented CL<sub>50</sub> less than 2.0 mg mL<sup>-1</sup>. These results demonstrated that the different colonial forms of *M. aeruginosa* are indicators of toxins levels during the blooms events.

**Key words:** cyanobacteria; hepatotoxins; Patos Lagoon; microcystins; *Microcystis aeruginosa*

### RESUMO

Florações de cianobactérias tóxicas, especialmente de *Microcystis aeruginosa* têm sido registradas nas águas do estuário da Lagoa dos Patos por períodos irregulares nas últimas duas décadas. O presente trabalho teve como objetivos quantificar os níveis intracelulares de

Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4  
toxinas nas florações de *Microcystis aeruginosa* ocorrentes no estuário da Lagoa dos Patos entre abril de 1997 e julho de 1998, as suas

concentrações em relação as formas coloniais e sua toxicidade. Coletas mensais de amostras de água em superfície foram feitas com bomba de recalque e filtradas em rede de plâncton (55 µm). Estas amostras forneceram valores de parâmetros físicos e químicos *in situ* e biológicos

(contagem de células) em laboratório. Coletas complementares foram feitas através de arrastos em rede de plâncton (55 µm), para avaliar sua toxicidade. Todas as amostras coletadas foram concentradas, congeladas e liofilizadas a - 30 °C. As amostras desidratadas de *M. aeruginosa* foram utilizadas para análises de toxinas, e preparados extratos para os testes de toxicidade de 18h, utilizando-se náuplios de *Artemia* sp. Utilizou-se o método Trimmed Spearman-Kärber para o cálculo das CL<sub>50</sub>-18h de todos os testes. Foi constatada a ocorrência de cianobactérias somente entre o verão e outono de 1998. *Microcystis aeruginosa* foi a espécie dominante durante as florações de cianobactérias no estuário. Seus maiores valores de densidade populacional foram observadas entre os meses de março (1539 . 10<sup>2</sup> colônias L<sup>-1</sup>) e abril (4567 . 10<sup>2</sup> colônias L<sup>-1</sup>) de 1998. Nestes eventos, foram encontrados níveis máximos de microcistinas intracelulares nas florações de cianobactérias até 265,10 µg L<sup>-1</sup>. A toxicidade das amostras testadas apresentaram valores de CL<sub>50</sub> entre 0,71 e 5,67 mg mL<sup>-1</sup> p.s. As formas coloniais de *M. aeruginosa*, como IV, IVn, Va e VI, destacaram-se como as de maior correlação aos maiores níveis quantificados de microcistinas intracelulares, enquanto as formas IVn, IV e Va correlacionaram-se com as maiores toxicidades. Cerca de 60% das amostras testadas apresentaram CL<sub>50</sub> inferiores a 2,00 mg mL<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstram que diferentes formas coloniais de *M. aeruginosa* são indicadoras dos níveis intracelular de toxinas nos eventos de florações.

PALAVRAS CHAVES: cianobactérias; hepatotoxinas; Lagoa dos Patos; microcistinas; *Microcystis aeruginosa*;

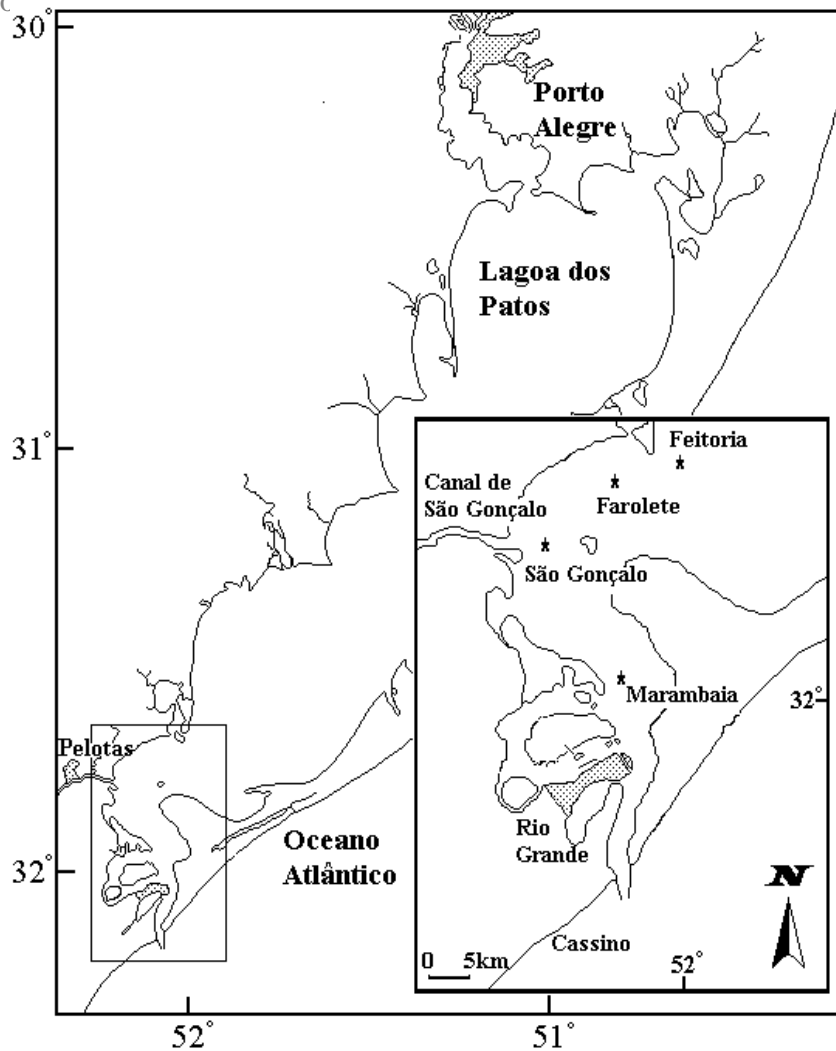
## INTRODUÇÃO

---

Ambientes estuarinos são ecossistemas extremamente importantes e responsáveis pelo equilíbrio e manutenção dos recursos marinhos. Na região sul do país, o estuário da Lagoa dos Patos (Fig. 1), apresenta uma elevada produção de peixes e crustáceos de interesse comercial, servindo de base a economia das cidades situadas as suas margens (Castelo, 1985).

Algumas cianobactérias são descritas como formadoras de massivas florações em ambientes aquáticos eutrofizados e poluídos (Mason, 1991). *Microcystis aeruginosa* tem sido descrita como responsável pela síntese hepatotoxinas causadoras de efeitos letais a animais e ao homem (Carmichael 1994, Codd 1995, Falconer 1999, Jochimsen *et al.* 1998, Pouria *et al.* 1998).

Florações de cianobactérias, em especial de *M. aeruginosa*, têm sido descritas na Lagoa dos Patos e seu estuário por períodos irregulares nas últimas 2 décadas (Odebrecht *et al.* 1987, Yunes *et al.* 1992). A toxicidade destas florações registraram doses letais (DL<sub>50</sub>-24h) que variaram entre 22 e 250 mg kg<sup>-1</sup> em testes com camundongos (Yunes *et al.* 1996b), enquanto em bioensaios com juvenis do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), um dos



**Figura 1** - Mapa da Lagoa dos Patos, com destaque da porção estuarina, com os pontos de coleta no quadro menor (\*).

recursos econômicos mais valiosos da pesca na região, a concentração letal ( $CL_{50-24h}$ ) foi de  $2,96 \text{ mg mL}^{-1}$  (Yogui *et al.* 1999).

Populações de *M. aeruginosa* são encontradas na natureza segundo características específicas quanto a forma e o tamanho de suas colônias. Estudos com populações do gênero *Microcystis* em lagos temperados, definiram características estruturais comuns dessas populações, agrupando-as em diversas formas coloniais, encontradas em diferentes fases de seu ciclo anual de crescimento (Reynolds *et al.* 1980).

Estudos realizados em lagos eutrofizados no Japão com florações de *Microcystis* destacaram importantes relações entre os valores quantificados de suas toxinas intracelulares (microcistinas) com os estágios de desenvolvimento colonial em que essas populações encontravam-se nesses ambientes (Watanabe *et al.* 1989, Park *et al.* 1998).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos tóxicos de cianobactérias sobre organismos zooplânctônicos, principalmente em microcústáceos (DeMott 1991, Campbell *et al.* 1994, Rapala 1998). O uso de *Artemia* sp. no monitoramento de florações nocivas de cianobactérias tem comprovado bons resultados em razão da boa correlação entre a quantidade de toxinas, com a mortalidade de organismos expostos (Campbell *et al.* 1994), como também a relativa facilidade do procedimento dos testes e os baixos custos operacionais gerados (Lawton *et al.* 1994).

O presente trabalho teve como objetivos quantificar os níveis intracelulares de toxinas nas florações de *Microcystis aeruginosa* ocorrentes no estuário da Lagoa dos Patos entre abril de 1997 e julho de 1998, as suas concentrações em relação as formas coloniais e sua toxicidade.

## METODOLOGIA

---

Coletas foram realizadas no estuário da Lagoa dos Patos em 4 pontos fixos de amostragem (Feitoria, Farolete, São Gonçalo e Marambaia) (Fig.1), com periodicidade mensal, entre abril de 1997 e julho de 1998, exceto o mês de fevereiro de 1998, à bordo da Lancha "Larus" da Fundação Universidade Federal do Rio Grande e da Lancha "Caçõ" da Polícia Naval do 5<sup>o</sup> Distrito Naval da cidade do Rio Grande.

Durante os cruzeiros, amostras de água em superfície foram coletadas através do uso de bomba de recalque (STIHL modelo P 835), e posteriormente filtradas em rede de plâncton (55 µm). Amostras complementares foram coletadas com arrastos em rede de plâncton (55 µm), para avaliar sua toxicidade.

Para identificação e a quantificação das densidades populacionais fitoplanctônicas, volumes de amostras de 50 mL do material coletado pela bomba de recalque foram extraídas e fixadas em solução de Transeau (formol: etanol: água, respectivamente, 1:3:6) em uma razão 1:1. A identificação e quantificação dos principais grupos fitoplanctônicos foi realizada em microscópio óptico binocular Studar Lab. Toda identificação foi realizada ao nível de classes, segundo Desikachary (1959), Ricard (1986), Sournia (1986) e Chrétienno-Dinet (1990) utilizando câmara de Sedgewick-Rafter (volume de amostra de 1 mL). Para identificação das formas coloniais de crescimento de *Microcystis aeruginosa* foram utilizadas as características propostas por Reynolds *et al.* (1980) para lagos temperados, como dimensão, flutuabilidade e formas das colônias, sendo quantificadas em uma câmara de Sedgewick-Rafter. Para cada amostra a ser analisada, foram realizadas três contagens, sendo calculada a média em organismos, colônias e filamentos L<sup>-1</sup> de água do ambiente.

Para a quantificação das células de *M. aeruginosa* foram utilizadas amostras coletadas e fixadas em Transeau dos pontos de coleta que apresentavam colônias deste organismo nas contagens anteriores. Este material foi submetido a digestão a quente com Hidróxido de Sódio (NaOH), segundo proposto por Reynolds & Jaworski (1978) e Box (1981), e modificado em laboratório, cuja solução final apresentou 0,03 M. Estas amostras foram mantidas em estufa a 70 °C por 40 minutos. Posteriormente ao tempo de digestão, foi realizada a contagem em Hematocítmetro de Neubauer (0,1 mm de profundidade) em

Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4

microscópio óptico binocular Studar Lab, a um aumento de 100 vezes. Para esta etapa, três contagens de cada amostra foram realizadas e a média expressa em células L<sup>-1</sup> de água do ambiente.

Todo o material restante coletado foi concentrado em garrafas plásticas (0,5 L), congelados e liofilizados a -30 °C, sendo o material liofilizado acondicionado em freezer até a sua dosagem de toxinas intracelulares. Para as análises das toxinas intracelulares das cianobactérias foram pesados 50 mg das amostras liofilizadas, diluídas em 1 mL de água deionizada, congeladas e descongeladas em alternância e ao final sonificadas à 20 Hz por 3 minutos. Após a sonificação, este extrato homogeneizado foi então filtrado em filtro de acetato de celulose, obtendo-se uma solução final que foi analisada no Kit de imunoenensaio específico para microcistinas EnviroGard (SDI, Newark, USA) segundo Chu *et al.* (1990), com limites de detecção entre 0,1 a 1,6 ng mL<sup>-1</sup> equivalentes a microcistina - LR. Este método também detecta outras hepatotoxinas como as nodularinas.

Para os testes de toxicidade a partir do material liofilizado (biomassa seca de *M. aeruginosa*), foram preparados 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<sup>-1</sup> de peso seco. O rompimento e a conseqüente liberação das toxinas na água foi possível através de congeladas e descongeladas em alternância, sendo ao final sonificadas à 20 Hz por 3 minutos. Esse material aquoso foi centrifugado cerca de 3500g por 10 minutos para precipitação das células rompidas. O sobrenadante foi extraído e utilizado no testes, quando os organismos foram expostos a 8 concentrações crescentes diluídas com um fator de diluição 0,5, a partir do extrato mãe. As concentrações das amostras testadas foram 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0 mg mL<sup>-1</sup> de peso seco, além do controle com a água do mar.

Todos os testes foram realizados com três réplicas para cada concentração de exposição dos organismos, enquanto o controle foi feito com 24 réplicas. Esses testes foram realizados em placas de poliestireno (96 poços-testes de 300 µl cada), com média de 18 indivíduos por poço. A duração dos mesmos 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. A partir dos resultados foram calculadas as CL<sub>50</sub>-18h de cada amostra, através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.* 1977). Os valores de CL<sub>50</sub>-18h foram expressos em miligramas de peso algáceo seco por mililitro de solução (mg·mL<sup>-1</sup> p. s.). 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.

Os resultados obtidos durante esse estudo foram armazenados em planilhas eletrônicas EXCEL (Windows 97). Análise de correlação (através do coeficiente de Pearson, com 5% de significância) foi realizada entre os valores medidos de toxinas intracelulares e as densidades das formas coloniais de *M. aeruginosa* encontradas durante o estudo. Utilizou-se o pacote estatístico "Statistica for Windows", versão 5, para a análise empregada.

## RESULTADOS

Cianobactérias sob a forma de colônias e filamentos foram encontradas no período de estudo exclusivamente durante os meses de verão e outono de 1998 (Fig. 2). Seus maiores valores de densidade populacional foram observadas entre os meses de março (1539 . 10<sup>2</sup> colônias L<sup>-1</sup>) e abril (4567 . 10<sup>2</sup> colônias L<sup>-1</sup>) de 1998. Nestes eventos, massivas florações deste grupo, representadas principalmente por *Microcystis aeruginosa*, apresentaram seus maiores valores de densidade celular (cél L<sup>-1</sup>) nos quatro pontos de coletas com valores até 7 . 10<sup>6</sup> cél L<sup>-1</sup> em abril de 1998 (Fig. 3). Entre as formas coloniais de *M. aeruginosa* registradas durante sua ocorrência foram observadas todas as 9 formas descritas por Reynolds *et al.* (1980), veja figura 4, com a predominância das formas III, IVn, IV e Va (Fig. 5), formas coloniais caracterizadas como formas planctônicas desta espécie (Reynolds *et al.* 1980).

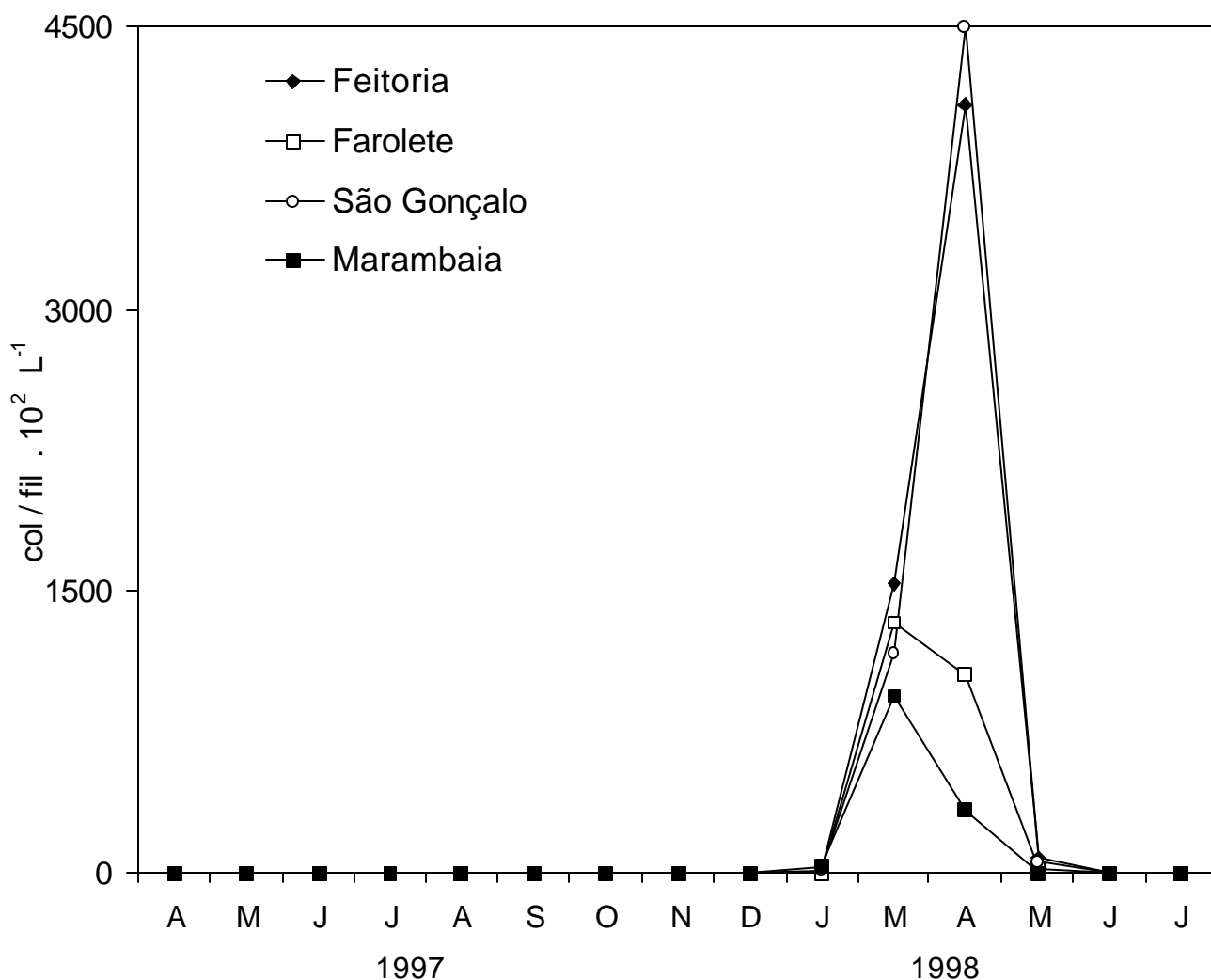


Figura 2 - Densidade populacional de cianobactérias (col / fil . 10<sup>2</sup> L<sup>-1</sup>) nos pontos de coleta no estuário entre 1997 e 1998.

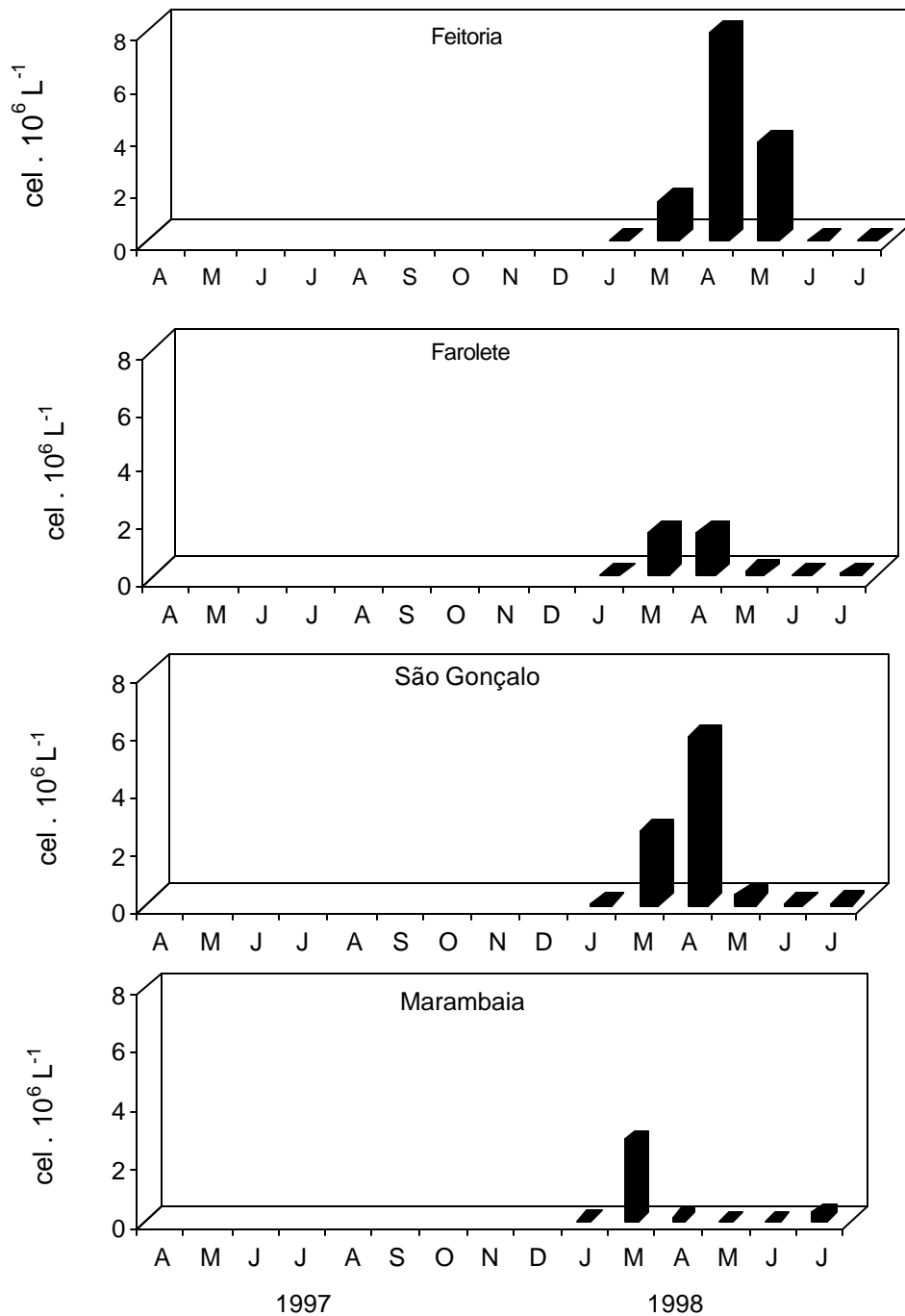


Figura 3 - Densidade populacional de *Microcystis aeruginosa* (cel  $L^{-1} \cdot 10^6$ ) nos pontos de coleta no estuário entre 1997 e 1998.

A presença de microcistinas foi detectada somente nos meses do verão e outono de 1998. Os maiores níveis de microcistinas estiveram compreendidos entre março e abril de 1998, com valores máximos entre 213,84 e 265,1  $\mu g L^{-1}$  em abril de 1998 (Tab. 1). Entre as formas de crescimento colonial de *M. aeruginosa* registradas no presente estudo, as formas

Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4 planctônicas Va, VI, IV e IVn destacaram-se por apresentarem correlação aos maiores níveis quantificados deste tipo de hepatoxina (Tab. 2)

. Valores quantificados de microcistinas intracelulares ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em superfície nos pontos de coletas no estuário da Lagoa dos Patos, entre 1997 e 1998. (\*) Valores abaixo do limite mínimo de detecção do método.

Pontos de Coletas	1997										1998				
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	M	A	M	J	J
Feitoria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,047	14,86	213,8	0,557	*	0,102
Farolete	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,29	3,61	265,1	0,718	0,082	0,077
São Gonçalo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,29	27,29	153,9	1,51	0,101	0,19
Marambaia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,141	5,66	6,06	0,101	0,136	0,15

**Tabela 2.** Resultado da Análise de Correlação entre densidade das formas coloniais de *M. aeruginosa* e os níveis intracelulares de toxinas quantificados. (\*) = Valor significativo de r do Coeficiente de Pearson para  $p < 0,05$ .

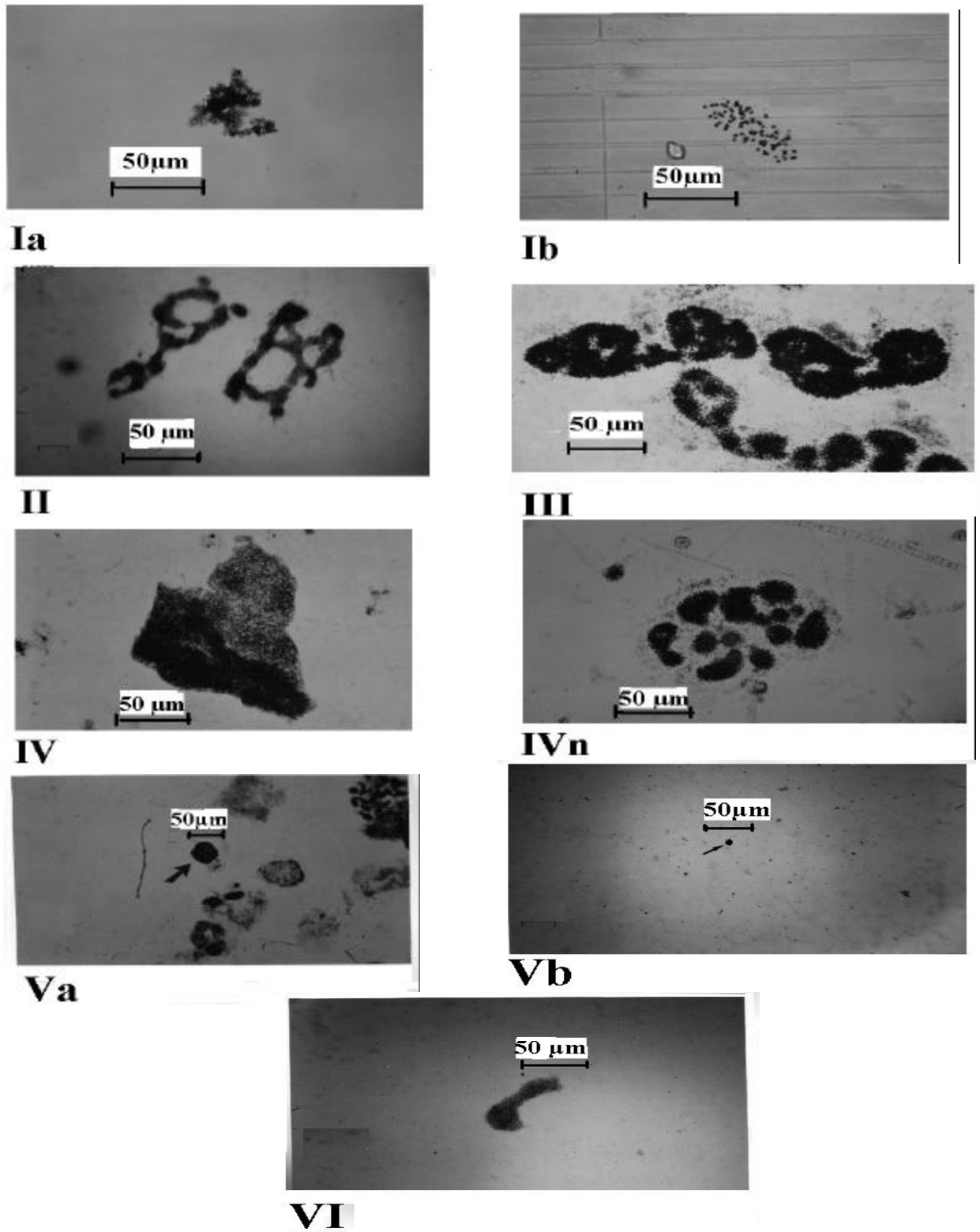
Toxinas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Formas coloniais de <i>M. aeruginosa</i>										
	Ia	Ib	II	III	IV	IVn	Va	Vb	VI	N	
Microcistinas	0	0,17	0,17	0,06	0,59 *	0,45 *	0,89 *	0,04	0,73 *	24	

A toxicidade das amostras testadas apresentaram variações de suas  $CL_{50-18h}$  entre 0,71 e 5,67  $\text{mg mL}^{-1}$  (Tab. 3). Entre as dez amostras testadas, seis (60%) apresentaram  $CL_{50-18h}$  inferior a 2,00  $\text{mg mL}^{-1}$ . Já os controles realizados em cada bateria de teste apresentaram todos menos de 10% de mortes dos náuplios expostos (Tab. 4), validando os testes e elucidando suas boas condições. Observou-se que as amostras com maior toxicidade continham as formas coloniais IVn, IV e Va predominantemente.

## DISCUSSÃO

A ocorrência de cianobactérias, inclusive de *Microcystis aeruginosa*, tem sido dominante em períodos de florações do fitoplâncton no Brasil, seja em ambientes de reservatórios, lagoas costeiras, lagos de inundação e outros lagos naturais (Huszar & Silva, 1999).

Foram constatadas a presença das nove formas coloniais de *M. aeruginosa* (Reynolds *et al.*, 1980) na região estuarina da Lagoa dos Patos durante o estudo. Matthiensen *et al.* (1999) evidenciou a presença de colônias de *M. aeruginosa* para toda região estuarina da Lagoa dos Patos ao longo de 12 meses, atribuindo áreas ao norte desse ambiente (estação Feitoria), como a principal fonte de entrada dessa espécie no estuário.



**Figura 4** - Formas coloniais de *M. aeruginosa* encontradas nos pontos de coleta no estuário entre janeiro e julho de 1998, a classificação das formas segue modelo proposto por Reynolds *et al.* (1980).

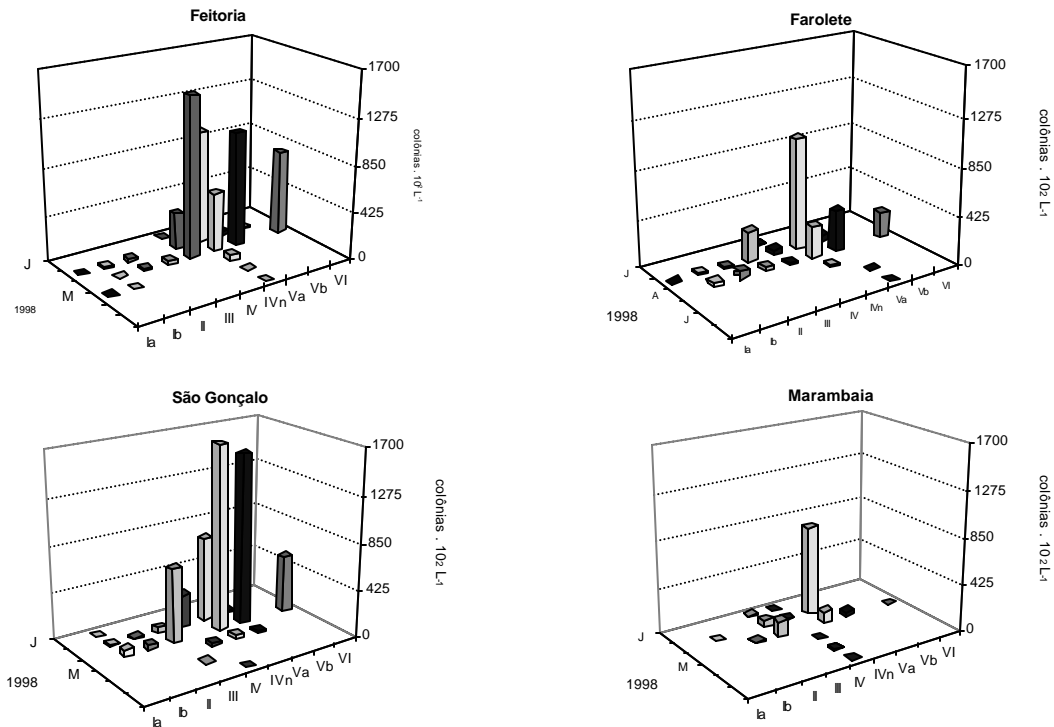


Figura 5. Densidade das formas de crescimento colonial de *M. aeruginosa* (colônias · 10<sup>2</sup> L<sup>-1</sup>) encontradas nos pontos de coleta no estuário entre janeiro e julho de 1998.

Durante os outros meses de coletas do presente estudo, baixos valores na densidade de células de *M. aeruginosa* foram observados e nenhuma toxina (microcistinas) foi detectada. Isto talvez seja causado pela presença de formas ocorrentes neste período, como as formas bentônicas e senescentes (Ia, Ib e Vb) de densidades e níveis de toxinas muito baixos. Esta constatação já havia sido feita anteriormente para o inverno e primavera na Lagoa dos Patos e seu estuário por Yunes *et al.* (1998a) que detectaram valores abaixo de 3 µg g<sup>-1</sup> de peso seco, em amostras contendo somente estas formas coloniais nesses ambientes.

Entre as formas coloniais de *M. aeruginosa* registradas no presente estudo, as formas planctônicas IV, IVn, Va e VI destacaram-se com as de maior correlação com os maiores níveis quantificados de toxinas (microcistinas) intracelulares. Esse tipo de correlação, entre formas coloniais de *Microcystis* com níveis quantificados de toxinas (microcistinas) intracelulares é condizente com o encontrado por Watanabe *et al.* (1989) e Park *et al.* (1993; 1998) em lagos eutrofizados no Japão. Tais autores atribuem uma variabilidade espaço-temporal na presença e quantidade de toxinas (microcistinas) produzidas por florações de *Microcystis* não somente as espécies formadoras dessas populações durante os eventos de floração, mas também ao estágio colonial em que esses organismos encontravam-se em suas florações. Normalmente formas coloniais planctônicas de *Microcystis* são propensas a concentrarem maiores quantidades de toxinas (microcistinas) intracelulares, do que aquelas sob estágio senescente ou estacionário de seu ciclo de crescimento (Watanabe *et al.* 1989, Park *et al.* 1998).

Tabela 3. Valores de CL<sub>50</sub>-18h (mg mL<sup>-1</sup> p. s.) obtidos nos testes de toxicidade realizados com as amostras ambientais coletadas no verão de 1998.

Amostras	Estação de coleta	Mês/ano	CL <sub>50</sub> -18h (mg mL <sup>-1</sup> )	INTERVAL O DE confiança (95%)	% de abundância colonial
1	Feitoria	Jan/98	0,71	0,65-0,78	IV (100%)
2	São Gonçalo	Jan/98	5,67	5,04-6,37	Ib (100%)
3	Farolete	Mar/98	1,41	1,25-1,58	IV (97%)
4	Feitoria	Mar/98	2,34	2,09-2,63	IVn (70%), IV (25%)
5	Marambaia	Mar/98	2,76	2,18-3,51	IVn (90%), III (08%)
6	São Gonçalo	Mar/98	0,76	0,54-1,07	IVn (60%), IV (25%)
7	Farolete	Abr/98	1,47	1,29-1,66	Va (45%), IVn (35%)
8	Feitoria	Abr/98	1,99	1,80-2,19	IV (40%), Va (30%)
9	Marambaia	Abr/98	2,84	2,53-3,18	III (45%), IVn (35%)
10	São Gonçalo	Abr/98	1,58	1,45-1,72	IVn (35%), Va (35%)

Tabela 4. 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	5 e 6	2,87
III	7, 8, 9 e 10	8,66
IV	2 e 4	9,72
V	3	3,81

Os valores registrados de toxinas (microcistinas) intracelulares nesse estudo variaram entre 0,1 e 265,1 mg mL<sup>-1</sup>. Estes valores são compatíveis com as variações dos valores descritos em trabalhos anteriores no mesmo local (Yunes *et al.* 1996 a, \_\_1998a, b) e próximos dos valores encontrados por Hirooka *et al.* (1998) e Coelho *et al.* (1998) em lagos e reservatórios no país, utilizando o mesmo método de detecção empregado no presente estudo. Estes valores estão compreendidos em um nível médio de concentração quando comparados aos valores descritos em trabalhos com florações de *Microcystis* em outros países como: Japão (Watanabe *et al.* 1992, Park *et al.* 1993, \_\_1998), China (Ueno *et al.* 1996), Dinamarca (Christoffersen 1996), Alemanha (Fastner *et al.* 1999) e Austrália (Falconer 1999).

De acordo com a classificação proposta por Lawton *et al.* (1994), os resultados obtidos nos testes apresentaram de média a alta toxicidade. Seis amostras testadas apresentaram valores de CL<sub>50</sub> inferior a 2 mg mL<sup>-1</sup>, o que representa uma alta toxicidade. As outras quatro amostras restante analisadas, tiveram média toxicidade (entre 2 e 10 mg mL<sup>-1</sup>), com seu menor valor de toxicidade de 5,67 mg mL<sup>-1</sup>. A toxicidade das amostras de *M. aeruginosa* neste estudo foram superiores quando comparados com o valor médio de florações nos últimos 5 anos nesse ambiente (Tab. 5) ( Yunes *et al.* 1996 a), resultado este que torna-se mais expressivo pelo elevado número de amostras testadas (N= 10). As formas planctônicas

Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4 IVn, IV e Va de *M. aeruginosa* destacaram-se como as de maior toxicidade durante os testes, visto apresentarem maiores percentuais de abundância nas amostras testadas e demonstrarem a capacidade de concentrarem maior teor de toxinas intracelulares durante eventos de floração (Watanabe *et al.* 1992, Park *et al.* 1998)

Tabela 5. Toxicidade das florações de *M. aeruginosa* na Lagoa dos Patos nos períodos verão/outono 1993-1994, 1994-1995 e 1995-1996. Valores das CL<sub>50</sub>-18h (em testes com náuplios de *Artemia* sp.) e respectivos intervalos de confiança (95%) (Yunes *et al.* 1996 a). <sup>a</sup> *M. aeruginosa* PCC 7813 cepa tóxica do Inst. Pasteur. <sup>b</sup> *M. elabens* cepa não tóxica do Inst. de Microbiologia Aplicada da Universidade de Tóquio.

ESTAÇÃO DE COLETA	DATA	CL <sub>50</sub> -18h (mg mL <sup>-1</sup> )	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
<i>M. aeruginosa</i> PCC 7813 <sup>a</sup>	-	0,13	0,11-0,15
<i>M. elabens</i> M177 <sup>b</sup>	-	>40,00	
Microcistina – LR	-	0,0028	0,0025-0,0031

A maior toxicidade das florações do verão de 1998, pode ser explicada pelo 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 (Yunes *et al.* 1996 a). Isso porque as amostras coletadas em maio de 1994, quando Yunes *et al.* (1996 a) encontraram valores de clorofila *a* superiores a 9000 µg L<sup>-1</sup> 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. Logo, as amostras coletadas em 1998, provavelmente representavam o início da fase exponencial das florações, quando as células estão no seu estado ótimo de metabolismo e todas as toxinas estão presentes no interior das células.

Florações de cianobactérias têm sido mundialmente descritas como causadoras da intoxicação e mortes de animais domésticos e selvagens (Carmichael 1994, Codd 1995, Falconer 1999). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as águas que atingem o estuário da Lagoa dos Patos estão sujeitas a presença de florações tóxicas de *Microcystis* numa frequência anual, principalmente após os meses de verão. Esta constatação deixa evidente o sério risco da presença destas florações de cianobactérias sobre a biota estuarina (Yunes *et al.* 1996 a, Yogui *et al.* 1999) e populações humanas que utilizam estas águas em atividades de lazer ou pesca, tendo em vista a comprovada ação nociva destas toxinas em seres humanos (Jochimsen *et al.* 1998, Pouria, *et al.* 1998, Falconer 1999) e sua possível bioacumulação ao longo da cadeia trófica (Eriksson *et al.* 1989, Christoffersen 1996).

---

## CONCLUSÕES

---

Florações de cianobactérias, especialmente de *Microcystis aeruginosa*, foram incidentes sobre as águas do estuário da Lagoa dos Patos entre os meses de verão e outono de 1997 a 1998, reduzindo-se nos demais períodos estudados.

A presença de microcistinas em águas estuarinas evidenciou o contínuo impacto nesse ambiente de toxinas de cianobactérias numa frequência anual, principalmente após os meses de verão.

Ficou evidenciado que durante a ocorrência das florações de *M. aeruginosa*, as formas coloniais planctônicas (IV, IVn, Va e VI) dessa espécie estão associadas com os maiores níveis quantificados de toxinas (microcistinas) intracelulares e toxicidades.

Os testes de toxicidade realizados com náuplios de *Artemia* sp. demonstraram que as florações de cianobactérias ocorridas no verão de 1998 apresentaram média e alta toxicidade, o que reforça os riscos do potencial tóxico dessas florações a biota e populações humanas que utilizam estas águas para a pesca e lazer.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BOX, J.D. 1981. Enumeration of Cell Concentration in Suspension of Colonial Freshwater Microalgae, with Particular Reference to *Microcystis aeruginosa*. *Br. Phycol. Jour.*, **16**: 153-164.
- 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

- Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4
- Hepatotoxic (microcystin-LR-containing) Cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **9**: 71-77.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Sc. Amer.*, January, pp 64-70.
- CASTELLO, J.P. 1985. La Ecología de los Consumidores del Estuario de la Lagoa dos Patos, Brasil. In: Yáñez-Arancibia (ed) Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards and Ecosystem Integration. Univ Nac Aut Mexico Press, Mexico, pp 383-406.
- CHRÉTIENNO - DINET, M.-J. 1990. Atlas du Phytoplancton Marin 3: Chlorophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées et Tribophycées. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 261 pp.
- CHRISTOFFERSEN, K. 1996. Ecological Implications of Cyanobacterial Toxins in Aquatic food webs. *Phycologia*, **35**: 42-50.
- CHU, F.S., HUANG, X. & WEI, R.D. 1990. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Microcystins in the Blue-green algal Blooms. *Jour. Assoc. Offic. Analy. Chemist.* **73**: 451-456.
- CODD, G.A. 1995. Cyanobacterial Toxins: Occurrence, Properties and Biological Significance. *Wat. Sc.. Tech.*, **32** (4): 149-156.
- COELHO, M.C.L.S, HACHICH, E.M., CARVALHO, M.C., SOUZA, R.C. & SATO, M.I.Z. 1998. Detecção de Microcistinas em águas Superficiais através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA): Resultados Preliminares. In: V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia (Resumos), Itajai, SC, Brasil, p.63.
- 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
- DESIKACHARY, T.V. 1959. Cyanophyta. Monographs on Algae. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 686p.
- ERIKSSON, J.E., MERILUOTO, J.A.O. & LINDHOLM, T. 1989. Accumulation of a Peptide Toxin from the Cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the Freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia* **183**: 211-216.
- FALCONER, I.A 1999. An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Gree Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreation Water. In: LIU, D.L & DUTKA, B.J.(Eds), *Environ. Toxic.*, **14** (1): 5-12.
- FASTNER, J., NEUMANN, U., WISING, B., WECKESSER, J., WIEDNER, C., NIXDORF, B. & CHORUS, I. 1999. Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptides) in German Fresh Water Bodies. *Environ. Toxic.*, **14**: 13-22.
- 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)
- HIROOKA, E.Y., PINOTTI, M.H.P., TSUTSUMI, T. YOSHIDA, F. & UENO, Y. 1998. Microcystins in Environment and Water Plant in the State of Parana, Brazil by Sensitive Immunoassay, In: 4<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria (Abstracts), Beaufort, North Carolina, USA, p. 34.
- HUSZAR, V.L.M. & SILVA, L.H.S. 1999. A Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudo. *Limnotemas*, **2**, Julho 1999.

Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4

- JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., NA, J., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B. de C., FILHO, D.A de M., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, SM.F.O. & JARVIS, W.R. 1998 Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Haemodialysis Center in Brazil. *News Engl. Jour. Med.*, **338** (13), 873-878.
- 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.
- MASON, C.F. 1991. **Biology of Freshwater Pollution**. John Wiley & Sons, Inc. New York, 351pp.
- MATTHIENSEN, A., YUNES, J.S. & COOD, G.A. 1999. Ocorrência, Distribuição e Toxicidade de Cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Rev. Brasil. Biol.*, **59**, **2**: 1-15
- ODEBRECHT, C., SEELIGER, U., COUTINHO, R. & TORGAN, L.C. 1987. Florações de *Microcystis* (Cianobactérias) na Lagoa dos Patos, RS. Pap. Pres. Simp. Ecos. Cost. Sul e Sud. Bras.: Sínt. Conh. Cananéia, S.P., April 11-16.
- PAERL, H.W. & USTACH, J.F. 1982. Blue-green Algal Scums: An Explanation for their Occurrence During Freshwater Blooms. *Limn.. Ocean.*, **27** (**2**): 212-217.
- 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. Toxic. Water Quality*. **13**: 61-72.
- PARK, H.-D., WATANABE, M.F., HARADA, K.-I., NAGAI, H., SUZUKI, M., WATANABE, M. & HAYASHI, H. 1993. Hepatotoxin (microcystin) and Neurotoxin (anatoxin-a) Contained in Natural Blooms and Strain of Cyanobacterial from Japanese Freshwaters. - *Natural Toxins* **1**: 353-360.
- 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. *The Lancet* **352**: 21-25.
- RAPALA, J. 1998. **Toxin Production by Freshwater Cyanobacteria: Effects of Environmental Factors**. Thesis of PhD, University of Helsinki, Finland, 63p.
- REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G.H.M. 1978. Enumeration of Natural Microcystis Populations. *Br. Phycol. Jour.* **13**: 269-277
- REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G.H.M., CMIECH, H.A. & LEEDALE, G.F. 1980. On the Annual Cycle of the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa* (Kütz. Emend. Elenkin.) *Phil. Trans. Royal Soc., London*, B **293**: 419-477.
- RICARD, M. 1986. Atlas du Phytoplancton Marin **2**: Diatomophycées. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 297 pp.
- SOURNIA, A. 1986. Atlas du Phytoplancton Marin. **1**: Cyanophycées, Dictyophycées et Raphidophycées. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 219p.
- UENO, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., WATANABE, M.F., PARK, H.-D., CHEN, G.-C & YU, S.-Z 1996. Detection Microcystins, a Blue-green Algal hepatotoxin, in Drinking Water Sample in Haimen and Fusui, Endemic Areas of

- Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A. L. de (editores) *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*, São Carlos, RiMa, 2000, ISBN:85655305-4
- Primary Liver Cancer in China, by Highly Sensitive Immunoassay. - *Carcinogenesis* **17**: 1317-1321.
- WATANABE, M.F.; HARADA, K.L.; MATSUURA, S.; OISHI, S.; WATANABE, Y. & SUZUKI, M. (1989) Heptapeptide Toxins Contained in Natural Samples of *Microcystis* species. *Toxicity Assessment*. **4**: 487-497
- YOGUI, G.T., SALOMON, P.S., MONSERRAT, J.M., MONTEIRO, N.J.C. & YUNES, J.S. 1999. The Effect of Cyanotoxins in Crustacean Bioassays *In*: VII Congresso Brasileiro de Limnologia (Resumos): 556 pp.
- YUNES, J.S., MATHIENSEN, A., PARISE, M., SALOMON, P.S., RAGGETT, S. L., BEATTIE, K. A. & CODD, G. A. 1998a. *Microcystis aeruginosa* Growth Stages and the Occurrence of Microcystins in the Patos Lagoon, Southern Brazil. REGUERA, B., Blanco, J., FERNÁNDEZ, M. L. & WYATT, T. (Eds) *In*: Harmful Algae. *Xunta de Galicia Intergovern. Ocean.. Comm. of Unesco*, Vigo, Espanha, 18-21.
- YUNES, J.S., NIENCHESKI, L.F.H. & CODD, G.A. 1996a. The Effect of Nutrient Balance and Physical Factors on The Control of Cyanobacterial Blooms in the Patos Lagoon, Southern Brazil. *European Economic Community Report*, Jul/96, 40 pp.
- YUNES, J.S., NIENCHESKI, L.F.H., SALOMON, P.S., PARISE, M., BEATTIE, K. A. , RAGGETT, S. L. & CODD, G.A. 1998b. Effect of Nutrient Balance and Physical Factors on Blooms of Toxic Cyanobacteria in the Patos Lagoon, Southern Brazil. *Verh. Inter. Verein Limn.*, **2**: 1796-1800.
- YUNES, J.S., ODEBRECHT, C., NIENCHESKI, L.F.H. & CODD, G.A. 1992. Efeito do Balanço de Nutrientes e de Fatores Físicos na Ocorrência de Florações de Cianobactérias. *Pap. Pres. 2nd Enc. Ecotoxicol. Rio Grande, Brazil, December 3-4*.
- YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATHIENSEN, A., BEATTIE, K.A., RAGGETT, S.L. & CODD, G.A. 1996b. Toxic Blooms of Cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *Jour. Aquat. Ecosys.. Health.*, **5**: 223-229.