

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**EFEITOS AGUDOS EM *Paramecium caudatum*
(ALVEOLATA: CILIOPHORA), EXPOSTOS A CEPAS DE
CIANOBACTÉRIAS E AMOSTRAS DA COMUNIDADE
FITOPLANCTÔNICA**

Layne do Amaral Vilas Boas

Itajubá/MG

2018

EFEITOS AGUDOS EM *Paramecium caudatum* (ALVEOLATA:
CILIOPHORA), EXPOSTOS A CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS E
AMOSTRAS DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA

por

Layne do Amaral Vilas Boas

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, da Universidade Federal de Itajubá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca
Co-orientador: Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Itajubá-MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
INSTITUTO DE RECURSOS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Layne do Amaral Vilas Boas**

Título:

**Efeitos agudos em *Paramecium caudatum* (Alveolata: Ciliophora),
expostos a cepas de cianobactérias e amostras da comunidade
fitoplanctônica**

À Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Ana Lucia Fonseca (orientadora)
Unifei – Universidade Federal de Itajubá

Prof. : Prof. Dr. Roberto Junio Pedroso Dias (co-orientador)
Unifei – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dra. Andreia Maria da Anunciação Gomes
IFRJ-Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Niterói

Prof. Dr. Marcelo Chuei Matsudo
Unifei – Universidade Federal de Itajubá

Aprovada ()

Aprovada com Restrições ()

Reprovada ()

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Itajubá por me proporcionar a oportunidade de realizar o sonho de ser mestre e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À minha orientadora professora Ana Lucia Fonseca, por todo apoio, confiança, incentivo e otimismo ao longo da realização dos trabalhos.

Ao meu coorientador, Roberto Dias, por sempre estar disposto, mesmo longe, a sanar qualquer dúvida sobre o projeto

À Professora Andreia Gomes, que com toda dedicação e paciência acolheu-me no laboratório de botânica cedendo equipamento, material e conhecimento de modo que acrescentou demais ao trabalho e jamais esquecerei a resposta que recebi quando agradei toda a ajuda “ah, que isso, é apenas minha obrigação como professora”.

Aos profissionais da PRPPG e financeiro, que sempre se apresentaram dispostos a resolver qualquer problema e ajudar sempre no que fora preciso.

Às técnicas Elaine e Tânia e o técnico Paulo pelas boas conversas, pelo carinho e prontidão em auxiliar nos trabalhos realizados, tirando sempre qualquer dúvida relacionada ao andamento do experimento, sendo professores quase que em todo momento.

Aos alunos de graduação, Ciro e Wanda por toda ajuda no laboratório, sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos professores do programa por todo o aprendizado nas disciplinas, os quais complementaram em muito para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos que conheci durante esta jornada, em especial ao Wesley, companheiro tanto em sala de aula quanto fora, nas festinhas, barzinhos, cantinas; amigo nas horas vagas, sempre pronto para ouvir e dar ótimos conselhos e ainda às vezes “dar carteirada” durante os sufocos.

Ao Grilo, além de “padrinho da pós”, sempre disposto a tirar qualquer dúvida acerca do funcionamento da Unifei, mesmo sendo de outro

programa, me trouxe vários conselhos e ajudas e nas horas vagas foi companheiro de bar e som.

À querida Jéssica, minha “veterana do laboratório”, um obrigada especial. A todo o momento estive pronta para ajudar em tudo o que fosse necessário, foi quem me ensinou os primeiros passos do trabalho, dando total suporte. Muito obrigada mesmo por toda ajuda e amizade durante essa jornada.

Às minhas queridas amigas de sempre, Rafa e Érika, que estão comigo desde antes desta caminhada, dando apoio para nunca desistir e o colo para sempre ter onde chorar.

Ao meu companheiro, Raphael, que chegou de mansinho no meio de tudo isso, acabou ficando e até mesmo meio que me orientou na escrita do trabalho. Não me deixou desistir em nenhum momento e se não fosse por ele, com certeza eu não conseguiria chegar até o fim.

À minha mãe Rose, por sempre apoiar e acreditar que aquela garotinha hiperativa, “dos olhos arregalados”, um dia seria cientista e que sempre foi um exemplo de luta e determinação.

Às minhas irmãs Layla, Lidiane e Luise por toda amizade e companheirismo mesmo estando todas tão geograficamente distantes, me ampararam a todo o momento.

Aos meus queridos amigos que perduraram da graduação, Matheus, Mari H., Isa e Mari Pires, que a todo o momento me deram dicas e auxiliaram no que fosse possível neste trabalho e de quem sinto muitas saudades.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular da microcistina, formada por um Heptapeptídeo cíclico. Fonte: ALMEIDA, 2013..... 19
- Figura 2.** Pontos de coleta no córrego José Pereira, próximo ao Campus da Unifei, Fonte: Google Earth..... 28
- Figura 3.** Cultivo das cepas de cianobactérias (MIRS-04) mantidas a temperatura controlada de 25°C, e radiação de 45 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A); processo de centrifugação das cepas MIRS-04 e NPCD-1 (B)..... 30
- Figura 4.** Processo de liofilização da cepa MIRS-04. (A) Liofilizador. (B) Amostras em processo de liofilização e (C) material liofilizado..... 30
- Figura 5.** Croqui da montagem dos ensaios ecotoxicológicos com *P. caudatum* expostos a cepas de *Microcystis* (MIRS-04), produtora de MC-LR e NPCD-1, não produtora de MC-LR e amostras da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ..... 33
- Figura 6.** Curva de crescimento para *P. caudatum* em conjunto com arroz com casca macerado..... 34
- Figura 7.** Ensaio preliminar de exposição aguda em 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L^{-1} de massa celular liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR..... 35
- Figura 8.** Ensaio preliminar de exposição aguda em 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L^{-1} de massa celular liofilizado de *Microcystis* sp. (NPCD-1), não produtora de MC-LR..... 36
- Figura 9.** Dados de densidade fitoplanctônica do ponto 1, coletadas durante os períodos chuvoso e seco de 2007 na Lagoa de Jacarepaguá/RJ. Fonte: GOMES et al., 2009..... 38
- Figura 10.** Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L^{-1} após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, da estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (55%), *M. aeruginosa* (32%) e *Planktothrix* sp. (8%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007..... 39
- Figura 11.** Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L^{-1} após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação de seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007..... 39
- Figura 12.** Dados de densidade fitoplanctônica do ponto 2 coletadas durante os períodos chuvoso e seco de 2007 na Lagoa de Jacarepaguá/RJ. Fonte: GOMES et al., 2009..... 40

- Figura 13.** Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação de chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (49%), *Planktothrix* sp. (16%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007. 41
- Figura 14.** Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação de seca, com dominância de *Thalassiosira* sp. (59%), *S. aquatilis* (14%) e *Planktothrix* sp. (13%) coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007. 41
- Figura 15.** Concentração de clorofila-a, nos pontos 1 (a) e 2 (b), na lagoa de Jacarepaguá-RJ, onde PIII corresponde ao período estudado de fevereiro de 2007 a janeiro de 2008. Fonte: GOMES et al. 2009..... 42
- Figura 16.** Exposição aguda de 8h de *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR. 44
- Figura 17.** Exposição aguda de 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ de extrato biomassa liofilizada de *Microcystis* sp. (NPCD-1), não produtora de MC-LR. 45
- Figura 18.** Exposição aguda de 8 horas *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1.000 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR 45
- Figura 19.** Exposição aguda de *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1.000 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *Microcystis* sp. (NPCD-1), não produtora de MC-LR..... 46
- Figura 20.** Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (55%), *M. aeruginosa* (32%) e *Planktothrix* sp. (8%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007. 48
- Figura 21.** Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (49%), *Planktothrix* sp. (16%) e outras não identificadas (25%) coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007. 49
- Figura 22.** Ensaio 1 expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007..... 49
- Figura 23.** Ensaio 2 expondo *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1000 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada,

referente ao ponto 1, na estação seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007..... 50

Figura 24. Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação seca, com dominância de *S. aquatilis* (14%), *Thalassiosira* sp. (59%) e *Planktothrix* sp. (13%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição fitoplanctônica de amostras coletadas na Lagoa de Jacarepaguá – RJ, no ano de 2007 (período chuvoso e seco). 38

Tabela 2. Valores de concentração letal à 50% da população (CL50) de *Paramecium caudatum* expostos as amostras da comunidade fitoplanctônica coletados na lagoa de Jacarepaguá - RJ, no ano de 2007 em duas épocas do ano (períodos chuvoso e seco) em diferentes tempos de exposição (2, 4, 6 e 8h). 48

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1.INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1.Objetivo geral.....	16
2.2.Objetivos específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1. Cianobactérias e microcistinas.....	17
3.2. Ensaio ecotoxicológicos	22
3.3. Protistas ciliados e ensaios toxicológicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Coleta, cultivo e curva de crescimento de <i>Paramecium caudatum</i>	27
4.2. Produção das cepas liofilizadas de cianobactérias.	29
4.3. Ensaio Ecotoxicológicos.....	30
4.3.1. Ensaio preliminares.....	31
4.3.1.1. Ensaio com as cepas liofilizadas	31
4.3.1.2. Ensaio com amostras comunidade fitoplanctônica: Lagoa de Jacarepaguá/RJ.	32
4.3.2. Ensaio definitivos	32
4.3.2.1. Ensaio com as cepas liofilizadas	32
4.3.2.2. Ensaio com amostras da comunidade fitoplanctônica: Lagoa de Jacarepaguá/RJ.	33
4.3.3. Análises Estatísticas.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Curva de Crescimento: <i>Paramecium caudatum</i>	34

5.2. Ensaio Ecotoxicológico.....	35
5.2.1. Ensaio preliminar.....	35
5.2.1.1. Ensaio com as cepas liofilizadas	35
5.2.1.2. Ensaio com as amostras da comunidade fitoplanctônica: Lagoa de Jacarepaguá/RJ.	37
5.2.2. Ensaio definitivo	42
5.2.2.1. Ensaio com as cepas liofilizadas	Erro! Indicador não definido.
5.2.2.2. Ensaio com as amostras da comunidade fitoplanctônica: Lagoa de Jacarepaguá/RJ.	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO 1.....	60

RESUMO

VILAS BOAS, L. A. **Efeitos agudos em *Paramecium caudatum* (Alveolata: Ciliophora), expostos a cepas de cianobactérias e amostras da comunidade fitoplanctônica.** 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Itajubá. Itajubá. 2018.

Este trabalho teve como propósito avaliar os efeitos agudos na espécie *Paramecium caudatum* quando exposto a cepas liofilizadas de cianobactérias produtoras e não produtoras da cianotoxina microcistina (MCs), assim como o efeito de quatro amostras da comunidade fitoplanctônica coletadas em 2007 num ambiente hipereutrófico (Lagoa de Jacarepaguá/RJ) em dois períodos amostrais (seco e chuvoso). O objetivo foi estabelecer o intervalo da concentração letal de massa celular a 50% da população (CL50). Os organismos utilizados nos ensaios foram coletados no Ribeirão José Pereira, em Itajubá/MG, isolados e mantidos em cultivo no laboratório. Foram realizados ensaios preliminares e definitivos de exposição aguda utilizando de massas liofilizadas de duas espécies de cianobactérias do gênero *Microcystis*, das linhagens NPCD-1, não produtora de MCs e MIRS-04, produtora de MCs em 2, 4, 6 e 8 horas de exposição. Os resultados indicaram que a cepa não produtora de MCs (NPCD-1) mostrou-se mais tóxica, com menores valores de CL50, comparado aos ensaios com a cepa produtora de MCs (MIRS-04). Estes valores foram CL50-8h de 48,13 e 86,96 mg.L⁻¹ de massa celular liofilizada, respectivamente. Quanto aos resultados com as amostras da comunidade fitoplanctônica foi observado maior efeito agudo para as amostras coletadas na estação chuvosa, com dominância de espécies de cianobactérias *Aphanizomenon* sp. e *Planktothrix* sp, quando comparadas às amostras da estação de estiagem, com dominância da diatomácea *Thalassiosira* sp, *Synechocystis aquatilis* e *Oscillatoria* sp. *P. caudatum* é um organismo-teste de fácil manutenção em laboratório e se mostrou adequado ao uso em ensaios ecotoxicológicos com amostras de ambientes eutrofizados, justamente por ser início da teia trófica, o que poderá proporcionar informações sobre estudos de bioacumulação ou biomagnificação.

Palavras chave: Eutrofização, Protozoários ciliados, Ecotoxicidade, microcistinas

ABSTRACT

VILAS BOAS, L. A. **Acute effects on *Paramecium caudatum* (Alveolata: Ciliophora), exposed to strains of cyanobacteria and samples of the phytoplankton community.** 2018. 68p. Dissertation (Master's in Environment and Water Resources) - Federal University of Itajubá. Itajubá. 2018.

The main of this work was to evaluate the acute effects on *Paramecium caudatum* species when exposed to strain cyanobacteria which produce or not the cyanotoxin microcystin (MCs), as well as the effect of samples of phytoplankton community collected from a hypereutrophic environment (Jacarepaguá Lagoon/ RJ) in 2007 at two period (dry and wet) in two points. The focus was to establish the lethal concentration range of the cell mass in 50% of the population (LC50). The organisms were collected in Ribeirão José Pereira, in Itajubá - MG, isolated and kept in culture in laboratory. Preliminary and definitive acute essays were conducted with mass lyophilized of two strains of *Microcystis* genus, NPCD-1 non-MCs producer, and MIRS-04, producer MCs, during 2, 4 and 8 hours of exposure. The results indicated that non-MC-producer strain (NPCD-1) was more toxic, with lower LC50 values, compared to the MC-producer (MIRS-04). These values were LC50-8h of 48.13 and 86.96 mg.L⁻¹, respectively. In relation to LC50 values with phytoplankton community the results indicated a higher acute effect for the samples collected in the rainy season, with dominance of cyanobacterial species *Aphanizomenon* sp. and *Planktothrix* sp, when compared to the samples from the dry season, with dominance of the diatom *Thalassiosira* sp, *Synechocystis aquatilis* and *Oscillatoria* sp. *P. caudatum* is an easy to maintain laboratory culture and it has been proved to be suitable for use in ecotoxicological assays and in relation the position of the trophic web, may provide information on bioaccumulation or biomagnification studies.

Keywords: Eutrophication, Ciliated protozoa, Ecotoxicity, Microcystins

1. INTRODUÇÃO

O aumento das populações humanas de modo desenfreado é responsável por causar diversas alterações danosas ao ambiente natural, em que os ecossistemas aquáticos são os que mais sofrem com toda esta interferência de modo direto ou indireto.

A interferência direta sobre as corpos hídricos se dá através do uso da água como um recurso ambiental para o abastecimento humano e agroindustrial, o qual tem aumentado desenfreadamente nos últimos anos, sendo o consumo deste recurso maior do que o crescimento das populações humanas e conseqüentemente o aumento do despejo de poluentes tem também crescido nas ultimas décadas (TUCCI et al. 2001, TUCCI, 2005, 2008).

A entrada excessiva de material exógeno nos ambientes aquáticos alteram as propriedades físicas, químicas e biológicas, ou seja, o acréscimo de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio provindos do despejo de efluentes urbanos, agrícolas e industriais, assim como da lixiviação resultante do desflorestamento da mata ciliar causam a intensificação da produtividade primária dos organismos que compõem o fitoplâncton (BEGON et al. 2008; PAERL; HUISSIMAN, 2008). Como consequência, muitos outros organismos serão prejudicados.

O aumento de determinadas espécies de cianobactérias no corpo d'água pode causar a redução da luminosidade na água, o que reduz o metabolismo primário de organismos fotossintetizantes e conseqüentemente ocorre a redução da capacidade de dissolução do oxigênio no ambiente, assim como a anoxia do e redução da diversidade ali existente (ZOHARY; ROBARTS, 1990).

Paerl et al. (2016) defendem que além do aumento dos nutrientes presentes, as alterações climáticas, principalmente pelo aumento da temperatura da água tem contribuído para o aumento na frequência das florações fitoplanctônicas nestes locais, havendo sobreposição das populações de cianobactérias em relação às outras espécies ali presentes.

Alguns autores defendem que em resposta evolutiva para proteção contra a herbivoria, algumas espécies de cianobactérias produzem toxinas como parte de seu metabolismo secundário, as quais são classificadas de acordo com sua farmacologia como hepato, dermato ou neurotóxicas (FALCONER, 1993; ARAUJO, 2009; LI et al., 2012)

Dentre as cianotoxinas mais estudadas têm-se as microcistinas (MCs), nodularinas e cilindrospermopsina, as quais são produzidas por cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, *aphanizomenon*, entre outros (ARAUJO, 2009; ALMEIDA, 2013).

As MCs são responsáveis por causar deformações nos hepatócitos de vertebrados e quando expostos por longos períodos podem apresentar tumores em órgãos como o fígado. Casos de intoxicação por cianotoxinas em humanos podem ocorrer através da ingestão da água contaminada ou por peixes provindos de corpos d'água onde há florações tóxicas (LI et al., 2012). Até a presente data, foram descritas mais de 100 variáveis, (MOLICA; AZEVEDO, 2009; SVIRCEV et al., 2017).

Os efeitos tóxicos das MCs sobre organismos aquáticos têm sido analisados através de testes ecotoxicológicos, de exposição aguda, realizadas com altas concentrações em curto período de exposição, ou crônicas, onde a exposição ocorre em concentrações subletais e por um período representativo do ciclo de vida dos organismos.

Há uma diversidade de efeitos tóxicos causados pelas MCs sobre diferentes organismos aquáticos, porém muitos ensaios e análises da presença desta toxina têm sido realizados utilizando espécies zooplanctônicas como organismos-teste (FERRÃO-FILHO, 2009), como Cladoceros do gênero *Daphnia* sp por serem sensíveis, apresentarem ciclo de vida curto e consequentemente capazes de se reproduzirem rapidamente (HERRERA et al., 2014; SMUTNÁ et al., 2014).

A utilização dos protozoários ciliados como indicadores de qualidade ambiental em ensaios ecotoxicológicos se mostra eficaz pelo fato de serem cosmopolitas, apresentarem ciclo de vida curto, relativa vulnerabilidade às

alterações do ambiente, fácil cultivo e manutenção em laboratório e por fazerem parte de diferentes nichos, apresentam populações geneticamente semelhantes, (DIVE; PERSOONE, 1984; AMANCHI; HUSSAIN, 2010; MIRANDA; MARTINS, 2012). Por apresentarem curto ciclo de vida podem apresentar respostas acerca das alterações de modo rápido e eficaz; são organismos evolutivamente pouco complexos, sem parede celular e estão presentes em diferentes níveis na teia trófica, deste modo, podem ser decompositores, predadores, parasitas ou presas (ARAUJO, 2009; GOMIERO et al. 2013)

Como presa de organismos maiores, os ciliados desempenham papel importante no processo de bioacumulação e biomagnificação (BAGATINI, et al., 2013), por acumularem alguns compostos tóxicos podendo assim contaminar níveis mais elevados da cadeia alimentar.

Diante do exposto, a presente proposta visa contribuir com informações acerca dos efeitos agudos de cepas produtoras e não produtoras de MCs e amostras liofilizadas provindas da Lagoa de Jacarepaguá-RJ durante florações fitoplanctônicas, sobre os organismos da espécie *Paramecium caudatum*. Os valores da Concentração Letal a 50% da população (CL50%) poderão reforçar o uso destes organismos em ensaios ecotoxicológicos e conhecer sua relação com ambientes eutrofizados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Conhecer, através de ensaios agudos, o efeito de cianobactérias produtoras e não produtoras sobre a população do ciliado *Paramecium caudatum*, assim como de amostras liofilizadas de comunidades fitoplanctônicas presentes em um ambiente hipereutrófico, com ocorrências de florações frequentes de cianobactérias.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição aguda de células liofilizadas de cianobactérias produtoras e não produtoras de MCs em *P. caudatum*;
- Estabelecer o valor da Concentração Letal a 50% da população (CL50) de *P. caudatum* com os extratos liofilizados de cepas produtoras e não produtoras de microcistinas;
- Avaliar os efeitos da exposição aguda do material liofilizado da comunidade fitoplanctônica de uma lagoa hipereutrófica em *P. caudatum*;
- Estabelecer o valor da CL50 comparativa para *P. caudatum* entre amostras liofilizadas da comunidade fitoplanctônica coletadas durante as estações seca e chuvosa do ano de 2007, durante florações de cianobactérias em um lago hipereutrófico.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Cianobactérias e microcistinas

Um dos resultados negativos do processo de eutrofização é o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas. Como consequência ocasionará alteração no ambiente aquático devido à redução da luminosidade que chega ao fundo do ecossistema aquático, uma vez que pode formar uma camada superficial que impede a penetração da luz (HANSEN et al., 1994; MARINHO et al., 2005).

A eutrofização pode ocorrer de modo natural ou por ação antrópica onde estes nutrientes são provindos de fontes poluidoras como atividades agrícolas, industriais ou de efluentes domésticos (HUTCHINSON, 1957; BATISTA et al., 2013a; MACEDO; SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

As cianobactérias são organismos unicelulares, fotossintéticos, procariotos, gram-negativos, pertencentes ao domínio Bacteria. São cosmopolitas e generalistas, podendo ser encontradas nos diferentes ambientes aquáticos como os marinhos, dulcícolas e salobros, além dos terrestres (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; BELLINGER; SIGEE, 2015). Apresentam habilidade de formar grandes colônias vivendo em numerosas populações em ambientes aquáticos eutrofizados, o que contribui ainda mais para o processo de anoxia dos corpos d'água (SVIRCEV et al., 2017).

Um dos fatores que auxiliam para o aumento das florações de cianobactérias é resultante do aquecimento ambiental em nível de microclimas, pois tendem a apresentar melhor crescimento populacional em temperaturas maiores de 25°C e suas florações variam de acordo com as variáveis abióticas tais como: luminosidade, turbidez, pH, disponibilidade de nutrientes de acordo com a estação do ano, o que poderá ser distinto entre os diferentes corpos d'água (PAERL; HUISMAN, 2008; FRANCY et al.; 2015; PAERL et al., 2016).

As florações de cianobactérias em ambientes aquáticos eutrofizados apresentam riscos a diversos organismos presentes no corpo d'água, por produzirem cianotoxinas, as quais configuram como metabólitos secundários em resposta a diversos fatores estressantes do meio (FALCONER, 1993; ARAUJO, 2009; LI et al., 2012; PEARSON et al., 2010).

Segundo Carmichael (2001) e Dittman et al. (2013), as cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com os sintomas observados em vertebrados tais como: hepatotoxinas (microcistinas (MCs) e nodularina), neurotoxinas (anatoxina-a, saxitoxinas e β -Metilamino-L-alanina-BMMA), citotoxinas (cilindrospermopsina) e dermatotoxinas (lygyatoxina e aplysiatoxinas). As principais espécies de cianobactérias formadoras de florações tóxicas em ambientes de água doce são pertencentes aos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Planktothrix* (PEARL, 2008).

No Brasil, conforme Sant'Anna et al, (2008) e Dörr et al. (2010), foram descritas 32 espécies de cianobactérias tóxicas e os gêneros predominantes são *Microcystis* (7 espécies) e *Dolichospermum* (6 espécies). Dentre as espécies potencialmente tóxicas, *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* foram as mais frequentemente registradas, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais em que predominam as espécies produtoras de MCs.

De acordo com Dawson (1998), as MCs são heptapeptídeos cíclicos que possuem uma estrutura básica comum que sofrem variações na posição dos seus aminoácidos, o que garantem à molécula maior ou menor hidrofília e diferentes potenciais tóxicos (Figura 1), bem como a formação das diferentes variantes. Até o momento, foram identificadas em torno de 100, sendo as mais comuns a Microcistina – LR, Microcistina – RR e Microcistina – YR. Dentre estas a MC–LR apresenta o maior número de estudos acerca de efeitos tóxicos no ambiente e em outros organismos (PUDDICK et al., 2015).

Estudos com animais vertebrados indicam que a ingestão desta toxina via água contaminada, ou injeção intraperitoneal dependendo da concentração, podem causar destruição dos hepatócitos (SVIRCEV et al., 2017). Como resultado, o animal pode apresentar sintomas de cansaço, diarreia, vômitos, perda de apetite e se submetidos a longas exposições, podem desenvolver câncer com surgimento de tumores principalmente no fígado (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; FERRÃO-FILHO, 2009). Elas agem sobre o citoesqueleto, através de uma hiperfosforilação da estrutura celular, colapsando-a de modo a provocar deformações como precursores de tumores

hepáticos em animais vertebrados (McDERMOTT et al., 1998; LEAL; SOARES, 2004; KLAASSEN, 2010).

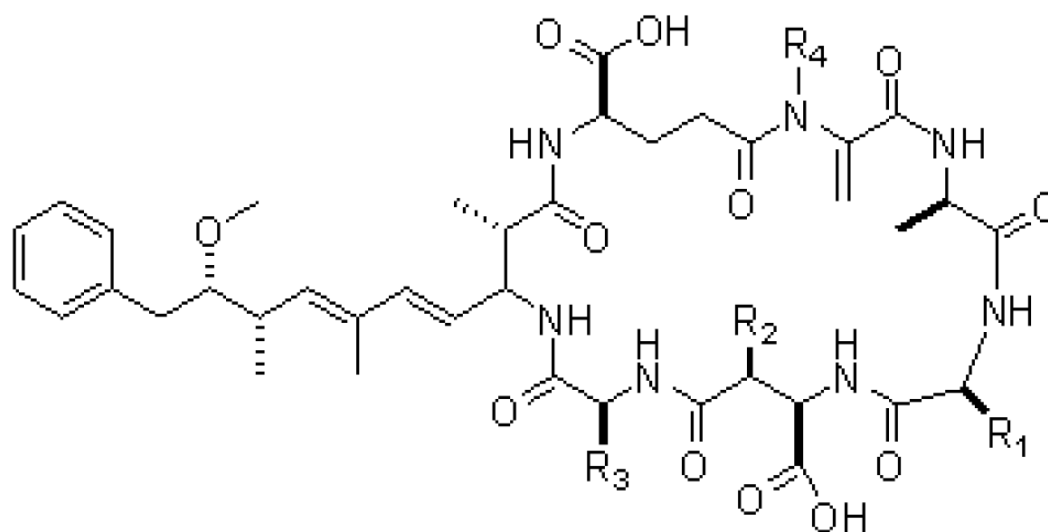


Figura 1. Estrutura molecular da microcistina, formada por um Heptapeptídeo cíclico. Fonte: ALMEIDA, 2013

Buratti et al. (2017) discorrem que quando ocorrem grandes florações de cianobactérias produtoras de MCs no meio aquático, o risco à saúde de vertebrados e invertebrados será em decorrência da liberação desta toxina pelo seu metabolismo, após a apoptose (morte celular) destas células. Os autores citam também a capacidade de bioacumulação e biomagnificação destas moléculas, o que compromete o consumo de peixes, por exemplo, pela população humana. Esses processos foram avaliados por Larson, et al. (2014) ao quantificar a concentração de MCs presente em zoobentos, zooplâncton e peixes presentes em quatro lagos eutrofizados da Suécia. Os resultados foram que organismos bentônicos e zooplânctônicos apresentaram concentrações maiores de MCs comparados aos peixes, indicando que a MC apresenta característica bioacumuladora, não podendo afirmar seu caráter biomagnificador.

O uso da água para abastecimento público proveniente de reservatórios no Brasil é bastante frequente (Reservatório do Funil, Furnas, dentre outros).

Svircev et al. (2017) discorrem que diversas intoxicações em humanos e outros animais, provavelmente, por MCs ocorreram ao longo da

história e em diversas partes do mundo, sendo o primeiro relato feito ao final do século XIX, na Austrália onde foram observadas mortes de diversos animais, além de injúrias e doenças em seres humanos que consumiam água de um lago eutrofizado.

No ano de 1996, no Instituto de Doenças Renais (IDR) de Caruaru/Pernambuco/Brasil foi registrado o primeiro caso de morte em humanos por intoxicação de MCs. O caso ocorreu em pacientes que passavam pelo tratamento de hemodiálise. Num total de 126 pessoas, 108 apresentaram sintomas de intoxicação como hepatomegalia, ascite, pele amarelada (icterícia), manchas vermelhas pelo corpo, uma forte anemia e falência renal. (POURIA, et al. 1998; AZEVEDO et al. 2002; YUAN et al., 2006; CHEN et al. 2009; DÖRR, et al. 2010). Esses autores citam a morte de 76 pacientes pelo envenenamento com MCs. A causa deste episódio foi à presença de cianotoxinas na água utilizada para tratamento renal, retirada do Açude Tabocas e posteriormente clorada antes de ser transportada para o Instituto. Cabe ressaltar que a adição de cloro provocou a lise celular, liberando a toxina, antes armazenada dentro das células de uma floração de *Microcystis sp.*

Efeitos de MCs têm sido avaliados nos organismos aquáticos, tais como peixes, anfíbios, insetos e microrganismos, por meio de ensaios ecotoxicológicos de exposição aguda ou crônica. Neste sentido, Su et al. (2016) realizaram ensaios com alevinos de Zebra Fish (*Danio rerio*) e demonstraram que a presença de MCs na água durante todo o estágio de desenvolvimento deste organismo resultou em danos que comprometem a manutenção da população. Os indivíduos expostos apresentaram atraso no desenvolvimento embrionário e larval como a redução no peso corpóreo, comprimento e maturidade sexual, além dos machos adultos apresentarem redução da fertilidade, alteração na síntese de hormônios sexuais como o luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH), produção de gametas e deformações celulares nas gônadas.

Para conhecer os efeitos de cianobactérias tóxicas sobre os animais vertebrados presentes no ambiente aquático, Oberem et al. (1999) utilizaram ovos de peixes das espécies *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* e *Leuciscus cephalus*; anfíbios das espécies *Ambystoma mexicanum*, *Triturus vulgaris* e *Rana ridibunda*. Através de testes agudos, estes autores puderam inferir os

efeitos das MCs sobre o desenvolvimento embrionário. Após 21 dias de exposição, a taxa de crescimento de *D. rerio* foi menor quando submetidos à concentração de $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a taxa de sobrevivência embrionária caiu em 40% quando expostos a 50 mg.L^{-1} de MC-LR. Enquanto isso, os anfíbios não apresentaram alterações negativas durante seu desenvolvimento.

Biotestes realizados por Toporowska et al. (2014) utilizaram invertebrados aquáticos, como larvas de *Chironomus* para avaliar o efeito da MC sobre estes animais por meio de ensaios agudos de toxicidade. Os autores expuseram as larvas a diferentes concentrações de extratos brutos de cianobactérias produtoras de MC-LR. Os resultados demonstraram relativa tolerância à toxina de modo que apenas em altas concentrações, $3,32 \text{ mg.L}^{-1}$, após 96 horas de exposição foi possível observar efeito de letalidade em 61% das larvas de *Chironomus* spp. Além disso, os sobreviventes apresentaram altos níveis de MC em seu organismo, podendo assim transpô-la para outros níveis da cadeia alimentar, sendo que estes animais servem de alimento para insetos aquáticos predadores, peixes e anfíbios.

Organismos zooplanctônicos apresentam papel importante como elo na cadeia alimentar aquática como consumidores primários do fitoplâncton e presas para peixes. Portanto, ensaios de exposição de MCs com estes organismos podem inferir a ação bioacumuladora ou biomagnificadora desta toxina. (HERRERA et al. 2014; SMUTNÁ et al. 2014; PAES et al. 2016).

Visando conhecer os efeitos das MCs sobre o zooplâncton, diversos trabalhos têm sido realizados com o cladóceros *Daphnia* (GER et al., 2016). Neste sentido, a presença de florações em ambientes aquáticos influencia a capacidade reprodutiva destes animais. Herrera et al. (2014), em testes agudos de toxicidade, expôs neonatos e *D. similis* a cinco diferentes concentrações celulares de *Microcystis wesenbergii* produtoras de MCs e obtiveram o valor da CL_{50} de 261, 94, 88 e $79 \mu\text{g.g}^{-1}$ em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, respectivamente.

Batista et al. (2013b) analisaram os efeitos da exposição aguda em três espécies de crustáceos, *Artemia salina*, *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*, para as cepas de cianobactérias, sendo duas produtoras (NPLJ-4 e TAC-95) e uma não produtora de MC-LR (*Microcystis* sp - NPCD). Nos ensaios realizados com *A. salina*, com a cepa não produtora de MCs (NPCD) foram

expostas às concentrações que variaram de 100 a 1200 mg.L⁻¹, embora a linhagem NPCD-1 seja conhecida por não produzir MC-LR, estes autores encontraram a concentração, através do teste ELISA, uma baixa concentração desta toxina, a qual fora quantificada em 1,6.10⁻³ µg/mg de extrato liofilizado. Com isso, não foi possível determinar a CL50-24h sobre este microcrustáceo, em contrapartida, quando expostas às cepas de *M. aeruginosa* (NPLJ-4) e *Microcystis* sp. (TAC-95), a LC₅₀-24h foi de 730 mg.L⁻¹ e 440 mg.L⁻¹ de extrato liofilizados, respectivamente, onde as concentrações de MC-LR foram de 5717,1 e 3675,1 mg.L⁻¹.

Os testes com *D. magna* apresentaram CE₅₀-24h de 1150 mg.L⁻¹ (1,9 µg.L⁻¹ de MC-LR), 260 mg.L⁻¹ (2.036,2 µg.L⁻¹ de MC-LR) e 140 mg.L⁻¹ (1.096,4 µg.L⁻¹ de MC-LR) de cepas liofilizadas de NPCD, NPLJ-4 e TAC-95, respectivamente, enquanto que os realizados com *C. dubia* apresentaram CE₅₀-24h de 580 mg.L⁻¹, 220 mg.L⁻¹ e 70 mg.L⁻¹ de cepas liofilizadas.

TAC-95 apresentou maior concentração de MC-LR e conseqüentemente, maior toxicidade para os três organismos testados, enquanto que NPCD produziu MC-LR em menor quantidade, sendo assim, menos toxica a eles.

Os exemplos acima citados demonstram que a presença de florações de cianobactérias do gênero *Microcystis* e a liberação de MCs podem apresentar riscos à comunidade aquática, bem como aos consumidores destes organismos.

3.2. Ensaios ecotoxicológicos

A ecotoxicologia aquática é uma ciência multidisciplinar, baseada em conceitos provenientes da Ecologia, Toxicologia, Física, Química dentre outras. É capaz de avaliar os efeitos de poluentes/ contaminantes sobre os organismos presentes nos ecossistemas (HOFFMAN et al., 2003; GHIGLIONE et al., 2016). Apresenta eficiência no prognóstico de riscos ambientais causados por determinadas substâncias despejadas nos corpos hídricos por partirem da premissa que os organismos são os melhores indicadores da qualidade ambiental, e não somente os resultados das variáveis físicas e químicas

(MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; ARAÚJO, 2009).

Segundo Ghiglione et al. (2017), a ecotoxicologia busca compreender o impacto de substâncias poluentes nos sistemas e com isso, fornecer ferramentas para monitorar a qualidade do ambiente e, se possível, restaura-lo. Esta ciência surgiu ao final dos anos de 1960, onde o toxicologista René Truhaut (1909*–1994†) a descreveu como a ciência que estuda as implicações causadas por um ou mais compostos químicos sobre os ecossistemas utilizando organismos vivos como sensores.

Os resultados de tais exposições podem inferir a ação destes contaminantes sobre populações e comunidades, por meio de diferentes parâmetros tais como mortalidade, efeitos na reprodução, crescimento, alterações bioquímicas, fisiológicas, genéticas, comportamentais e moleculares. Para tanto, diversos protocolos utilizando organismos para uso nos ensaios ecotoxicológicos foram elaborados em meados dos anos 80 tanto na Europa, como nos Estados Unidos (HOFFMAN et al. 2003; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; NEWMAN, 2015).

Os testes baseiam-se nos efeitos agudos ou crônicos de substâncias sobre os organismos em determinadas concentrações e sua exposição ao longo de um período definido.

O efeito agudo sobre os organismos-teste consiste em reconhecer a concentração letal da substância, sendo analisadas a mortalidade ou sua baixa mobilidade. Os organismos são expostos a altas concentrações da substância teste em curto espaço de tempo. Testes de toxicidade crônica são realizados em longo prazo, variando de acordo com o ciclo de vida da espécie utilizada, nele analisa-se o efeito da substância-teste em baixas concentrações (sub-letais) de modo que simule o estresse metabólico do composto no ecossistema (BORRELY, 2001; FERRÁRD; BLAISE, 2013).

Para a realização de bioensaios ecotoxicológicos é necessário que os organismos-teste sejam [1] representativos na cadeia trófica; [2] de fácil coleta, manuseio, identificação e cultivo em laboratório; [3] tenham um ciclo de vida curto; [4] Relativa sensibilidade a poluentes e [5] apresentar resposta rápida aos testes aplicados (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; NEWMAN, 2015).

Dentro destes critérios, os protozoários ciliados apresentam vantagens para uso nos ensaios de toxicidade com respostas rápidas por apresentarem tais características e possuírem populações geneticamente semelhantes, devido ao tipo de reprodução por cissiparidade e conjugação; (MADONI; ROMEO, 2006; AMANCHI; HUSSAIN, 2010; MIRANDA; MARTINS, 2012; GOMIERO et al. 2013).

3.3. Protistas ciliados e ensaios toxicológicos

Protistas ciliados são organismos eucariontes unicelulares de vida livre, que se apresentam em diferentes formas geométricas. São estritamente heterotróficos, distinguindo-se dos outros protozoários por possuírem caracteres específicos como a presença de macronúcleo e micronúcleo, possuem cílios sobre a superfície celular com funções distintas como locomoção e alimentação e são capazes de realizar conjugação como estratégia de troca do material genético (REGALI-SELEGHIM, 2006; LYNN, 2008).

Estes organismos estão presentes em diversos níveis tróficos, exercendo importantes funções dentro do ecossistema aquático, tais como a de presas para organismos maiores e de predadores de bactérias, de modo que são vistos como controladores populacionais destes organismos (GOMIERO et al. 2013). Por servirem de alimento a outros organismos, estes autores destacam que os protistas ciliados ao terem contato com substâncias tóxicas representam papel importante no processo de biomagnificação e com isso sua utilização como organismos-teste pode mensurar a ação da substância-teste sobre organismos maiores e sua interferência na cadeia alimentar.

Pauli et al. (2001) mencionam que em meados do século XX, programas de biomonitoramento através do estudo da diversidade passaram a apresentar protozoários como organismos bioindicadores de qualidade ambiental.

Ensaio ecotoxicológicos com crustáceos, peixes e ratos ou mesmo ensaios celulares com cortes histológicos de órgãos como o fígado apresentam alto custo e demandam maior tempo quando comparados aos realizados com protozoários ciliados.

Tais organismos como bioindicadores podem ser divididos em três grupos, de acordo com seu grau de susceptibilidade às alterações ambientais, sendo classificados em: [1] sensíveis [2] intermediários e [3] resistentes (MADONI; ROMEO, 2006).

Como alternativa rápida de resposta em relação aos efeitos de substâncias tóxicas, em 1978, dois pesquisadores, Persoone e Dive, revisaram os protocolos dos ensaios ecotoxicológicos com protozoários ciliados como organismos-teste, e a partir da década de 1980 disponibilizaram estes estudos, para testes de efeitos agudos e crônicos com os gêneros *Colpidium*, *Paramecium*, *Spirostomum* e *Tetrahymena*. (FÉRARD; BLAISE, 2013).

A formulação destes protocolos partiu da premissa destes organismos possuírem ciclo de vida curto; rápida taxa reprodutiva; fácil cultivo e manutenção em laboratório; semelhança genética entre os taxa; cosmopolitas e se encontram presentes em diferentes níveis da teia trófica (TWAGILIMANA et al., 1998; MADONI, 2000; MADONI; ROMEO, 2006; AMANCHI; HUSSAIN, 2010; MIRANDA; MARTINS, 2012; SARVESTANI et al., 2016).

Também por serem unicelulares e não possuírem tegumento, ou através da endocitose, proporcionam respostas rápidas em relação à absorção de contaminantes orgânicos ou inorgânicos. Além disto, existem muitos estudos sobre a bioquímica e fisiologia destes organismos o que permite sua aplicação em outras modalidades de ensaios (DIVE; PERSOONE, 1984).

Apesar de todas estas vantagens e de já possuírem protocolos, as informações disponíveis na literatura com protozoários ciliados como organismos-teste referem-se aos efeitos de metais e agroquímicos e não são bem relatados os efeitos com cianotoxinas/MCs.

O primeiro ensaio utilizando ciliados para conhecer os efeitos tóxicos das cianobactérias foi realizado por Ransom, et al. (1978). Os autores realizaram testes utilizando extratos liofilizados de cianobactérias das espécies *Anabaena flos-aquae*, *Fischerella epiptytica*, *Gloeotrichia echinulata* e *Nostoc linckia*, tendo como organismo teste o *Paramecium caudatum*. Os resultados comprovaram que a presença destes extratos, provocaram danos às populações destes ciliados, com total letalidade dos indivíduos expostos, com isto estes autores concluíram que a presença destas cianobactérias no

ambiente aquático pode causar intoxicação em *P. caudatum* do mesmo modo que trabalhos anteriores demonstraram estes efeitos sobre crustáceos.

Ward e Codd (1999) verificaram o efeito de quatro variantes de MCs purificadas (MC-LR, MC-LY, MC-LW e MC-LF) sobre protozoários ciliados da espécie *Tetrahymena pyriformis*, onde obtiveram a CL50–24h de 252 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 179 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente. A concentração de 85 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MC-LR causou inibição na taxa de crescimento da cultura, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para MC-LY, MC-LW e MC-LF. Outra variável analisada foi a taxa respiratória, onde a exposição de MC-LR a reduziu em torno de 38% após 24h.

Araújo (2009) avaliou o valor da CL50 de cepas algais coletadas em um reservatório durante eventos de floração e cepas de NPLJ-4 (*Microcystis aeruginosa*), com o intuito de conhecer os efeitos tóxicos destas sobre a população de *P. caudatum*. Em seu trabalho, a autora isolou a toxina MC-LR a partir de cepas cultivadas em laboratório e expôs os organismos a cinco diferentes concentrações (0,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$), delineando a média da CL50 em 24h em 9,85 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Tendo em vista estes resultados e a escassez de trabalhos utilizando os *Paramecium caudatum* como organismos-teste em toxicidade com cianotoxinas, sua aplicação se mostra promissor devido a sensibilidade apresentada por estes organismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta, cultivo e curva de crescimento de *Paramecium caudatum*.

Para aquisição de diferentes espécies de protozoários, foram realizadas coletas periódicas no sistema lótico da região sul do estado de Minas Gerais, na sub-bacia do Ribeirão José Pereira, cidade de Itajubá, no período de janeiro a março de 2017. As coletas se estenderam ao longo de um trecho urbano de aproximadamente 1,0 km do córrego José Pereira, próximo ao Campus Professor José Rodrigues Seabra da Universidade Federal de Itajubá - 45°27'31" e 45°20' 57W e 22°23'18" e 22°26'5"S) (Figura 2). Esse trecho do córrego, assim como os cinco pontos de coleta foram escolhidos com o intuito de obter a maior variedade de espécies de protozoários, principalmente aquelas que seriam utilizadas nos ensaios, haja visto que neste trecho há a presença de despejo de matéria orgânica provinda de dejetos humanos, de modo que haja grande quantidade de bactérias, as quais são fonte de alimento para os ciliados presentes no ambiente (VILAS BOAS, 2016).

As coletas de amostras de sedimento foram realizadas com auxílio de uma draga Van Veen adaptada. As amostras foram todas colocadas em garrafas PET de 500 ml, previamente lavadas e esterilizadas, sendo identificadas.

Após este procedimento, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Ecotoxicologia/Limnologia da Universidade Federal de Itajubá, onde foram separadas três alíquotas em placas Petri de cada ponto amostral. Em cada uma foi adicionado em torno de 10 ml do sedimento coletado, arroz com casca macerados em algodão e completados com de água mineral para o cultivo dos organismos. Essas placas de Petri foram transferidas para uma câmara incubadora BOD com fotoperíodo 12 horas e temperatura controlada de 25°C (MADONI, 2005).



Figura 2. Pontos de coleta no córrego José Pereira, próximo ao Campus da Unifei, Fonte: Google Earth.

Na primeira campanha, em janeiro de 2017, foram encontrados *P. caudatum* apenas no ponto quatro, onde havia maior presença de escoamento de esgoto doméstico e sombreamento. Nas campanhas seguintes, de fevereiro e março do mesmo ano, esta espécie foi encontrada em todos os pontos, com exceção do quinto, onde há escoamento do lago presente no campus da Unifei.

Exemplares de *P. caudatum* foram isolados em placas de polipropileno para cultivo celular com 48 poços, em quintuplicata, com auxílio de micropipetas de vidro confeccionadas no laboratório. Para cada poço alocou-se 10 indivíduos imersos em 0,75 ml de água mineral e como fonte de carbono para as bactérias, que são fontes de alimento para os ciliados, fora adicionado meio de cultura composto por arroz branco com casca macerado (MADONI, 2005). As placas foram mantidas em incubadora BOD com fotoperíodo 12 horas e temperatura controlada de 25°C.

Para a elaboração da curva de crescimento, foi realizado o cálculo da média aritmética dos organismos encontrados diariamente ao longo de 3 dias.

4.2. Produção das cepas de cianobactérias liofilizadas.

Para este estudo foram selecionadas cepas de *Microcystis wessemsberg* (MIRS – 04), coletadas no Reservatório de Samuel, em Rondônia, como a espécie produtora de MCs e *Microcystis sp.* (NPCD – 1), isolada do complexo lagunar de Jacarepaguá, Rio de Janeiro como sendo não produtora de MCs. Essas cepas foram adquiridas a partir do banco de cultivo de microalgas e cianobactérias, pertencente ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LECT, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os cultivos em grande escala de ambas as cepas teve como objetivo a obtenção de biomassa suficiente para posterior uso nos ensaios ecotoxicológicos. Para tanto, foram realizados cultivos de cada cepa em 8 litros de meio ASM-1, pH 7,0, de acordo com a metodologia proposta por Gorham et al. (1964) e mantidos sob intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 25°C e 12h de fotoperíodo.

Após os 15 dias de crescimento, os meios com as culturas das cepas MIRS-4 e NPCD-1 foram centrifugados a 4°C, velocidade de 5000 RPM durante 20 minutos. O material sobrenadante foi descartado e o decantado foi armazenado em freezer para posterior processo de liofilização e futuro uso nos testes ecotoxicológicos (figura 4B).

O processo de liofilização ou criodessecação consistiu no congelamento da cultura a baixas temperaturas, onde a água foi removida no vácuo de modo que as células foram conservadas por um grande período de tempo e utilizadas após seu descongelamento (TORTORA et al., 2012) (Figura 5). Todos estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Botânica na Universidade Federal de Itajubá, sob a supervisão da Profa. Andreia M. A. Gomes.

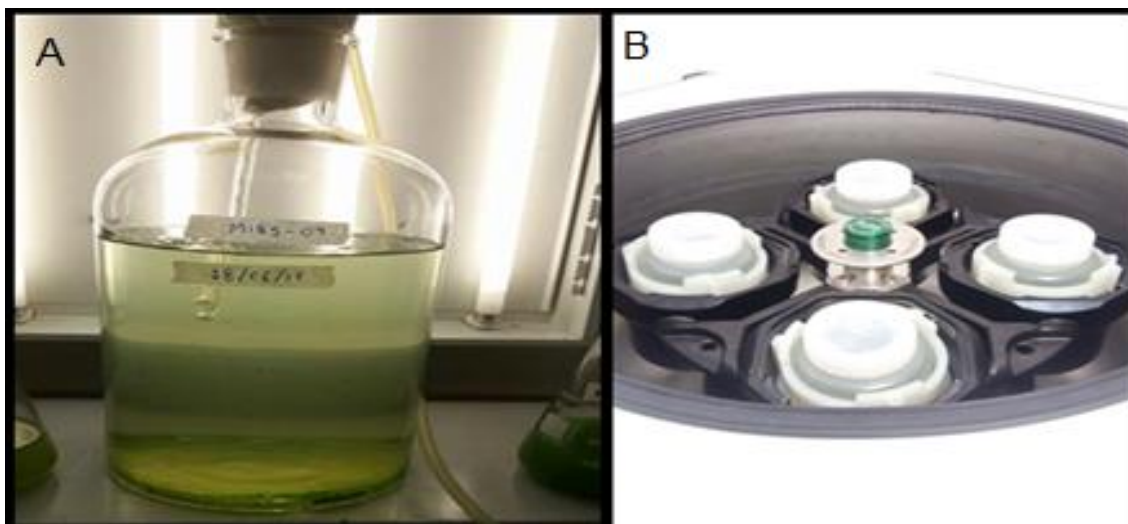


Figura 3. Cultivo das cepas de cianobactérias (MIRS-04) mantidas a temperatura controlada de 25°C, e radiação de $45 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (A); processo de centrifugação das cepas MIRS-04 e NPCD-1 (B).

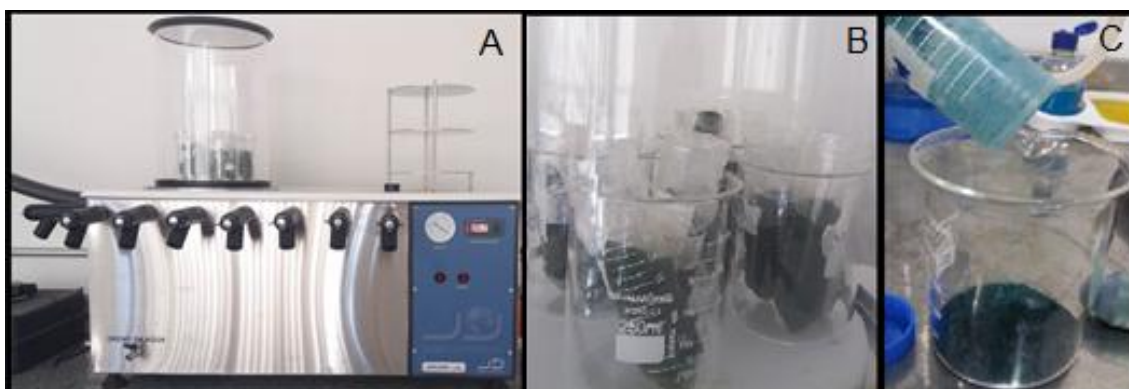


Figura 4. Processo de liofilização da cepa MIRS-04. (A) Liofilizador. (B) Amostras em processo de liofilização e (C) material liofilizado.

4.3. Ensaios Ecotoxicológicos

Neste trabalho foram realizados ensaios ecotoxicológicos utilizando protozoários ciliados da espécie *P. caudatum* como organismos-teste expostos a cepas isoladas de cianobactérias produtoras (*Microcystis wessemberg* - MIRS-04) e não produtoras de MC-LR (*Microcystis* sp. - NPCD-1) e amostras da comunidade fitoplanctônica coletadas na Lagoa de Jacarepaguá-RJ, as quais foram liofilizadas e cedidas pela profa. Andreia Gomes. O uso destas amostras justificou-se por esse ambiente se tratar de um sistema hipereutrófico, com frequentes ocorrências de florações de cianobactérias (Gomes et al. 2009).

4.3.1. Ensaio preliminares

A realização dos ensaios preliminares teve o intuito de determinar quais concentrações mínimas de massa celular ou toxinas seriam suficientes para realização dos ensaios definitivos, que por fim, tinham como objetivo a determinação dos valores de concentração letal de 50% (CL50) da população de *P. caudatum* expostos as diferentes amostras (figura 6).

4.3.1.1. Ensaio com as cepas de cianobactérias produtoras e não produtoras de MCs

Os ensaios foram realizados em placas para cultivo celular de poliestireno com 48 poços (perfurações). Com auxílio de pipetas de vidro, foram retirados 1,0 mL da cultura de *P. caudatum* após 72 horas de incubação, tempo este calculado através da curva de crescimento desta linhagem como fase log. A partir desse volume de cultura, foram separados 50 indivíduos da espécie *P. caudatum* e colocados 10 indivíduos em cada poço da placa de cultivo. Esse ensaio preliminar foi realizado em quintuplicata.

Foram selecionadas as concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ de massa celular liofilizada das cepas MIRS-04 e NPCD-1, baseado no princípio que 50 mg.L⁻¹ representa a concentração celular de um ambiente em baixa ou média eutrofização (MERILUOTO, et al., 2017). Sendo assim, essas concentrações de massa celular poderiam representar o efeito de elevadas biomassas fitoplanctônicas dos ambientes eutrofização sobre os *P. caudatum*.

A princípio o teste fora analisado após 2, 4, 8, 12 e 24 horas de exposição, onde as amostras coletadas em cada poço foram fixadas após este tempo de exposição, utilizando lugol, para uma posterior contagem do número de indivíduos sobreviventes. Após 12 e 24 horas observou-se que o número de indivíduos presentes nos poços referentes ao tratamento controle aumentou, mesmo sem a presença de alimento e com isso, pressupôs-se que esta população de *P. caudatum* seria capaz de aumentar após as 8 horas de exposição. Portanto, os testes passaram a ser analisados a cada 2 horas de exposição.

4.3.1.2. Ensaios com amostras comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ.

Para compreender a resposta do organismo-teste selecionado *P.caudatum* expostos às amostras de ambientes eutrofizados, foram realizados ensaios com amostras liofilizadas da comunidade fitoplanctônica coletadas em 2007, na lagoa de Jacarepaguá presente no Complexo Lagunar de Jacarepaguá, Rio de Janeiro (RJ), a qual apresenta grandes quantidades de despejos de materiais alóctones (GOMES et al. 2009).

Estas amostras foram cedidas pela professora Andreia Maria da Anunciação Gomes, do Instituto Federal do Rio de Janeiro, que estudou a dinâmica de organismos fitoplanctônicos presentes no ambiente nos meses de fevereiro de 2007 a janeiro de 2008, durante períodos de florações de cianobactérias tóxicas. Foram cedidas duas amostras referentes ao período chuvoso e duas coletadas no período seco, referentes aos pontos 1 e 2 em Gomes et al. (2009).

Assim como nos ensaios preliminares realizados com as cepas isoladas, as concentrações selecionadas também foram de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ e os tempos amostrais foram de 2, 4, 8, 12 e 24 horas de exposição, sendo as amostras fixadas com lugol e posterior contagem do número de indivíduos sobreviventes, conforme metodologia descrita anteriormente. Cabe ressaltar, que esses ensaios também foram realizados em quintuplicata e utilizados 10 indivíduos do organismo-teste em cada poço da placa de cultivo.

4.3.2. Ensaios definitivos

A partir dos resultados dos ensaios preliminares foi possível delinear as prováveis concentrações para inferir o valor de CL50 de cada cepa e amostra ambiental ao utilizar *P.caudatum* como organismo-teste.

4.3.2.1. Ensaios com as cepas de cianobactérias produtoras e não produtoras de MCs

Para se estabelecer os valores da CL50 de MIRS-04 e NPCD-01, foram selecionadas as concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ de material celular liofilizado ressuspenso em água mineral.

Na placa de cultivo as soluções referentes às concentrações foram dispostas em triplicatas contendo 10 indivíduos de *P. caudatum* em cada poço, totalizando 30 organismos/concentração. As observações foram realizadas após 2, 4, 6 e 8 horas de exposição. As placas foram mantidas em incubadora BOD a temperatura controlada de 25°C, por 8 horas no claro. Após cada período de exposição, as amostras foram fixadas com lugol para posterior contagem do número de organismos vivos (Considerou-se que a não presença do indivíduo representaria que estava morto no momento em que as alíquotas foram fixadas). A figura 5 representa a organização das placas de cultivo onde foram realizados os ensaios.

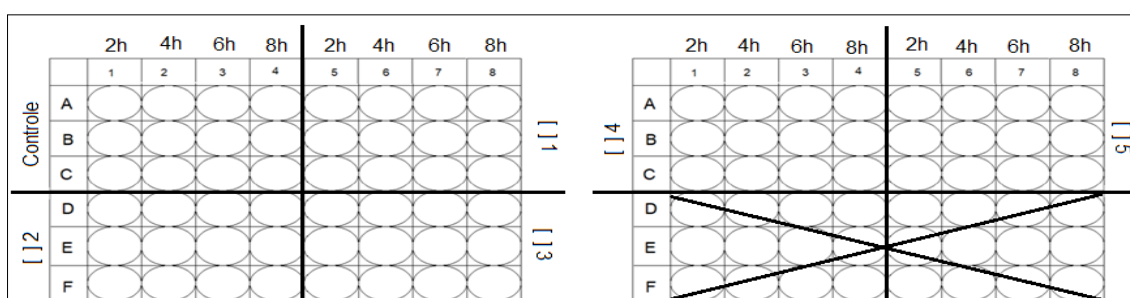


Figura 5. Croqui da montagem dos ensaios ecotoxicológicos com *P. caudatum* expostos a cepas de *Microcystis* (MIRS-04), produtora de MC-LR e NPCD-1, não produtora de MC-LR e amostras da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ.

4.3.2.2. Ensaios com amostras da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ.

Para estes ensaios foi adotada a mesma metodologia aplicada para as cepas isoladas e descritas anteriormente, inclusive com as mesmas concentrações (10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹) e tempos amostrais (2, 4, 6, 8h). Em função dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, foi realizado ensaios com material da amostra do PONTO 1, período chuvoso (15/08/2007) também na concentração de 750 e 1000 mg.L⁻¹.

4.3.3. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram registrados em planilhas do programa Microsoft Excel 2010 e plotados em gráficos de coluna para melhor observação dos resultados. O cálculo da CL50 foi realizado utilizando-se o programa Jsphear (Hamilton et al., 1977), o qual utiliza o método Probit (BLISS, 1934a, 1934b e 1935), com intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de Crescimento: *Paramecium caudatum*

A curva de crescimento foi realizada com o intuito de se conhecer a fase log de *P.caudatum* coletados e cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia/Limnologia da UNIFEI, para assim poder utiliza-los em ensaios ecotoxicológicos durante o auge da atividade metabólica destes organismos.

Os resultados indicaram uma atraso no crescimento de *P. caudatum* em todos os tratamentos contendo a clorofícea e que a fase log deste organismo iniciou após 3 dias de cultivo, ou seja 72 horas de cultivo celular (Figura 6).

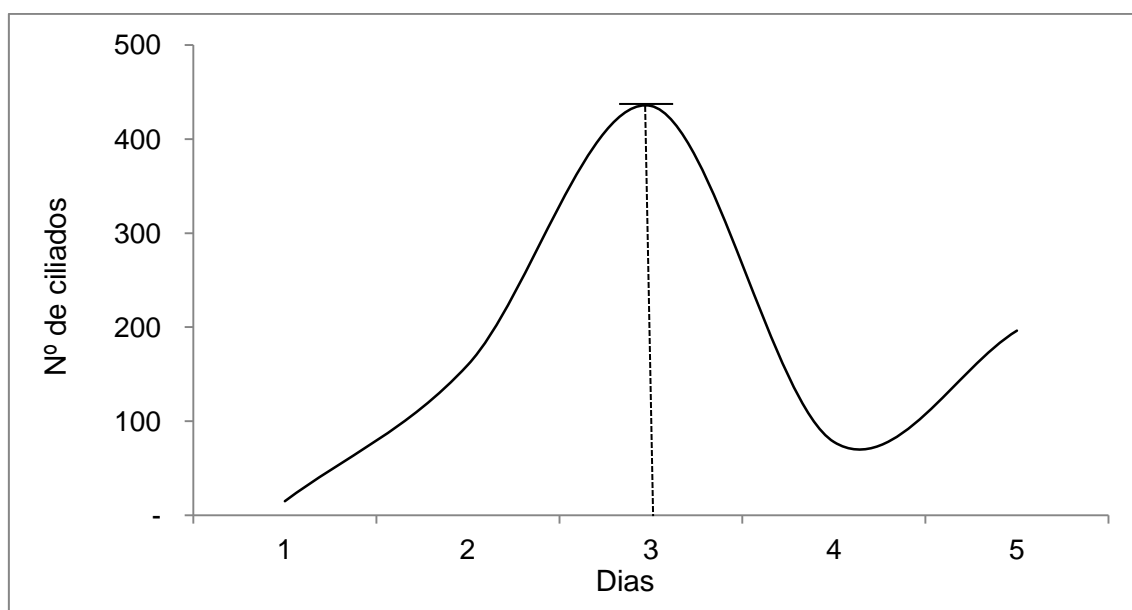


Figura 6. Curva de crescimento para *P. caudatum* em conjunto com arroz com casca macerado.

5.2. Ensaios Ecotoxicológicos

5.2.1. Ensaios preliminares

5.2.1.1. Ensaios com as cepas de cianobactérias produtora e não produtora de MC-LR

No ensaio preliminar com a cepa MIRS-04, a concentração de massa celular e o tempo de exposição foram diretamente proporcionais à taxa de mortalidade, de modo crescente, onde embora este experimento tenha sido realizado com apenas três concentrações, foi possível estimar o valor da CL50, a qual foi de 57,82 mg.L⁻¹ de cepa liofilizada. Este valor permitiu estimar a faixa de concentrações a serem utilizadas nos ensaios definitivos. (Figura 7).

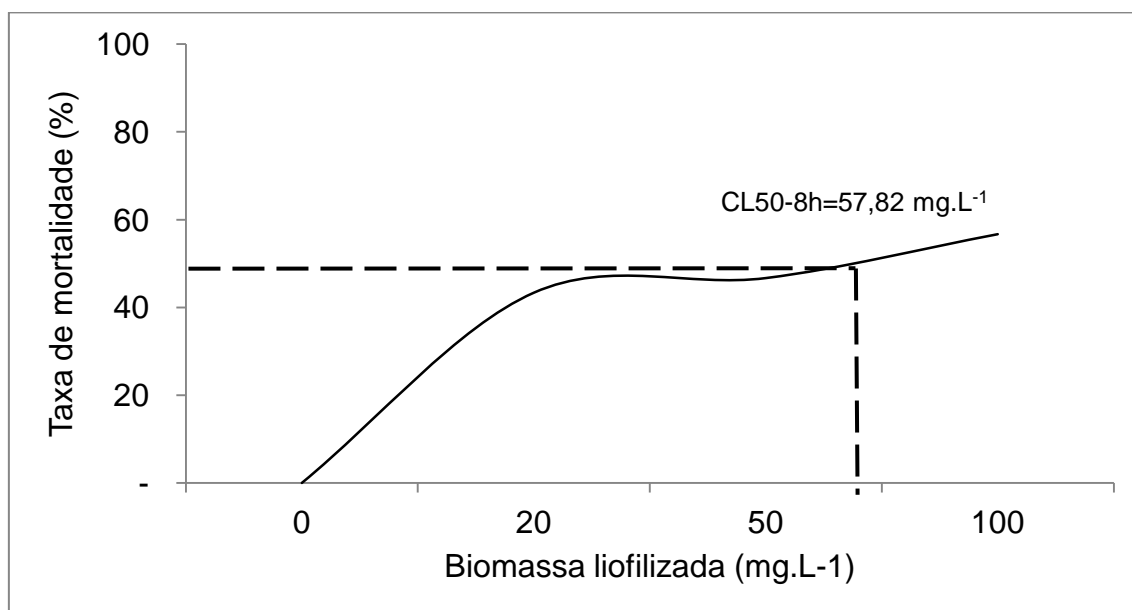


Figura 7. Ensaio preliminar de exposição aguda em 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ de massa celular liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR

Enquanto isso a exposição de *P. caudatum* às amostras contendo a massa celular da cepa NPCD-1, não produtora de MC-LR, apresentou mortalidade variável ao longo do tempo de exposição, na qual os efeitos observados indicaram que a letalidade a 50% da população ocorre após 2h e

8h de exposição com valores de CL50 muito semelhantes, de 84,10 e 82,78 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada respectivamente (Figura 8).

Os resultados reforçam que embora nesta cepa não tenha sido detectado a MC-LR, esta linhagem de *Microcystis* possui outros metabólitos secundários capazes de provocar efeitos de letalidade (COSTA; AZEVEDO, 1994). Fernandes (2016) detectou nesta mesma cepa a presença de compostos não identificados, os quais provocaram alterações morfológicas em larvas de *Astyanax altiparanae* e SILVA (2006) expõe que a cepa desta linhagem, NPCD-1, pode estar envolvida na produção de outros peptídeos possivelmente tóxicos e semelhantes à barbamida, utilizada no controle de moluscos.

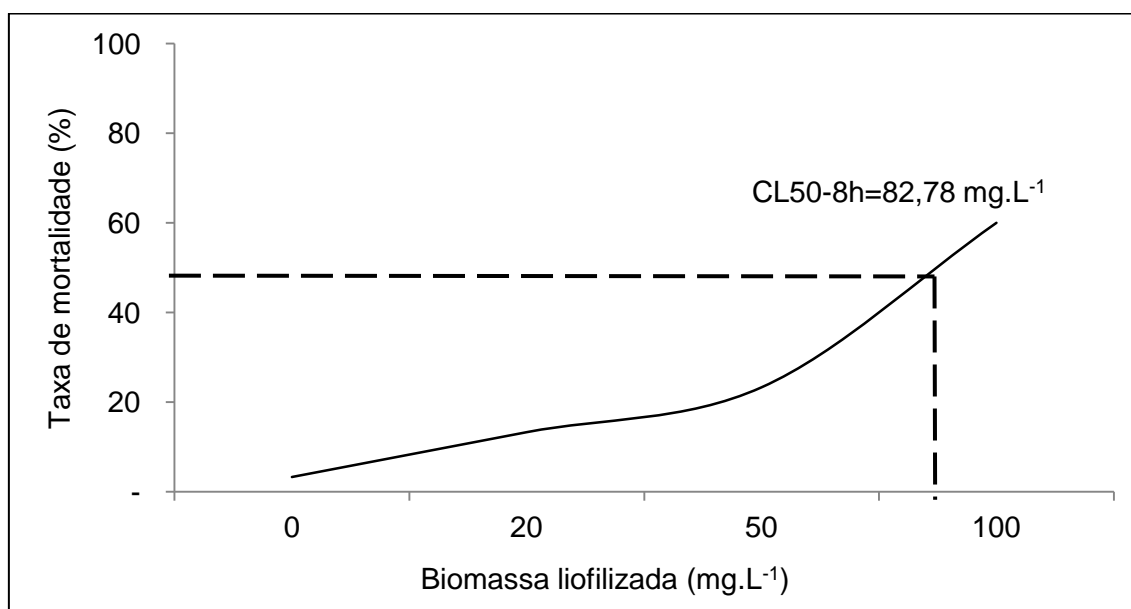


Figura 8. Ensaio preliminar de exposição aguda em 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ de massa celular liofilizado de *Microcystis* sp. (NPCD-1), não produtora de MC-LR.

Tabela 1. Valores de concentração letal em mg.L⁻¹ a 50% da população (CL50) de *Paramecium caudatum* expostos as amostras de cepas de cianobactérias produtoras (MIRS-04: *Microcystis wessemberg*) e não produtoras (NPCD-1: *Microcystis* sp.) de MCs, liofilizadas em diferentes tempos de exposição (2, 4, 6 e 8h) encontradas nos testes preliminares.

Tempo (horas)	MIRS-04 (mg.L ⁻¹)	NPCD-1 (mg.L ⁻¹)
2	-	84,10
4	-	-
6	-	-
8	57,82	82,78

5.2.1.2. Ensaio com as amostras da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ.

A lagoa de Jacarepaguá faz parte do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, na cidade do Rio de Janeiro (43°17' e 43°30'W; 22°55' e 23°00'S), ela possui uma área de 3,7 km² e profundidade média de 3,3 m (DOMINGOS, 2001 apud GOMES et al. 2009).

Segundo os dados abióticos presentes em Gomes et al. (2009), no período chuvoso da coleta houve um aumento da temperatura da água em torno de 10°C para a campanha realizada no período de chuva, quando comparado à temperatura marcada na seca, com o pH tendendo a ácido para P1 e para básico em P2 na coleta da estação chuvosa.

Outra característica apresentada é a anoxia em ambos os pontos coletados após 50 cm de profundidade, além da alta concentração de clorofila presente, sendo no ponto 1 em torno de 350 µg.L⁻¹ (seca) e 450 µg.L⁻¹ (chuva) e 450 µg.L⁻¹ (seca) e 350 µg.L⁻¹ (chuva) (Figura 15).

Na amostra referente à P1 coletada na estação chuvosa houve 55% de dominância das cianobactérias *Aphanizomenon* sp, 32% de *M. aeruginosa* e 8% de *Planktothrix* sp. (GOMES et al. 2009) no período chuvoso. Por outro lado, 88% da composição fitoplanctônica foi de *Oscillatoria* sp. para amostra coletada no período seco (Figura 9 e tabela 2).

Meriluoto et al. (2017) mencionam que *Aphanizomenon* sp. é um gênero de cianobactéria produtora das cianotoxinas cilindrospermopsina, anatoxina-a e saxitoxinas, de ação neurológica enquanto que *M. aeruginosa* e *Planktothrix* sp., produtoras de microcistinas de ação hepatotóxica em animais vertebrados, onde causa deformações no citoesqueleto de células hepáticas e renais.

A exposição inicial de *P. caudatum* a amostra de P1 no período chuvoso, demonstrou uma mortalidade expressiva a partir da concentração de 20 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada para o tempo de exposição de 8 horas (Figura 10), com valores de CL50-8h de 35,98 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada.

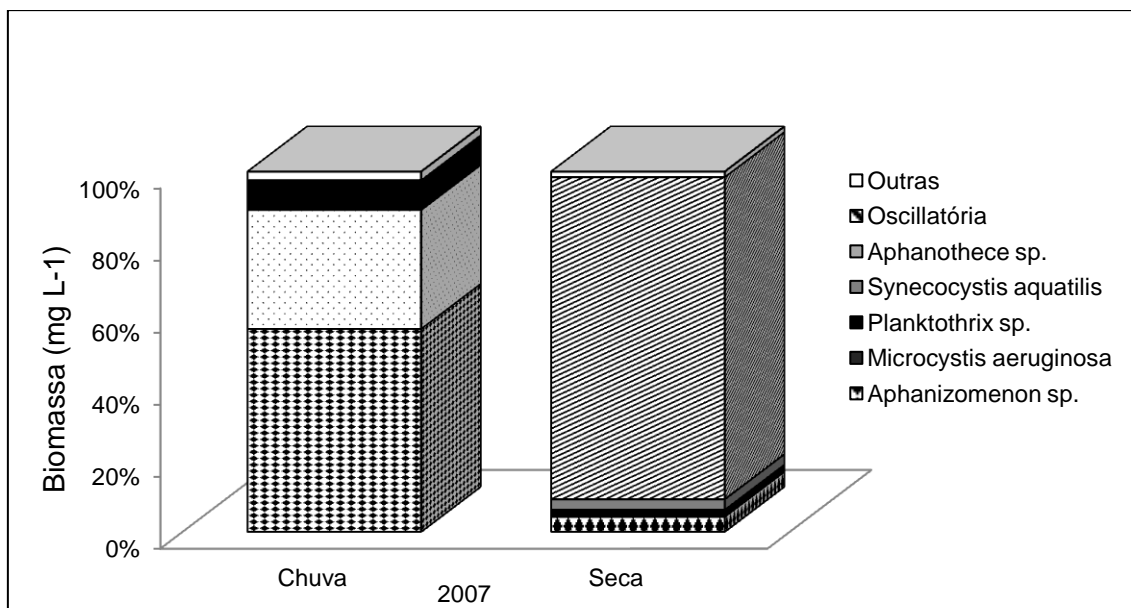


Figura 9. Dados de densidade fitoplanctônica do ponto 1, coletadas durante os períodos chuvoso e seco de 2007 na Lagoa de Jacarepaguá/RJ. Fonte: GOMES et al., 2009.

Tabela 2. Dominância fitoplanctônica presente nas amostras coletadas Lagoa de Jacarepaguá – RJ, no ponto 1, referentes às estações de seca e chuva no ano de 2007, (GOMES, et al., 2009).

Ponto 1			
Chuva		Seca	
Organismo	(%)	Organismo	(%)
<i>Aphanizomenon</i> sp.	55	<i>Oscillatoria</i> sp.	88
<i>M. aeruginosa</i>	32		
<i>Planktothrix</i> sp.	8		

A amostra de P1 do período de seca, apresentou dominância de *Oscillatoria* sp. em 88% da densidade fitoplanctônica total (Figura 10 e tabela 2), a qual causou um menor efeito sobre *P. caudatum* para as mesmas concentrações testadas após 8 horas de exposição.

Observou-se 50% de mortalidade na maior concentração de material liofilizado testado (100 mg.L^{-1}), porém no menor tempo (2h) com valores de CL50 de $73,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (2h) e $53,16 \text{ mg.L}^{-1}$ (8h) exposição (Figura 12 e tabela 4). Os resultados indicaram que a combinação de *Aphanizomenon* sp. com outras espécies de cianobactérias potencializaram o efeito comparado a apenas *Oscillatoria* sp. quando dominante.

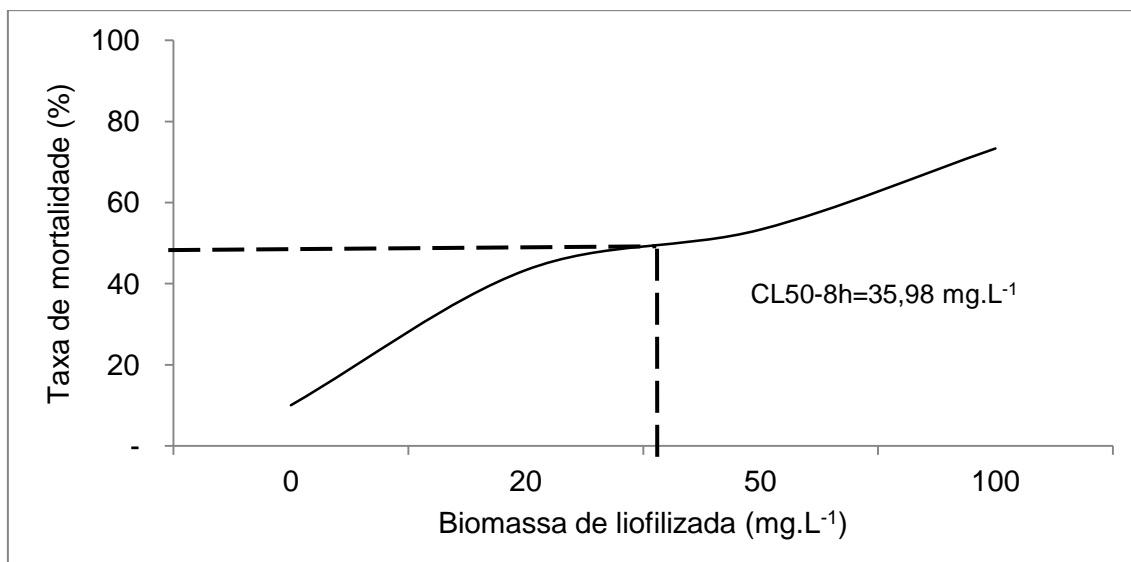


Figura 10. Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, da estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (55%), *M. aeruginosa* (32%) e *Planktothrix* sp. (8%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

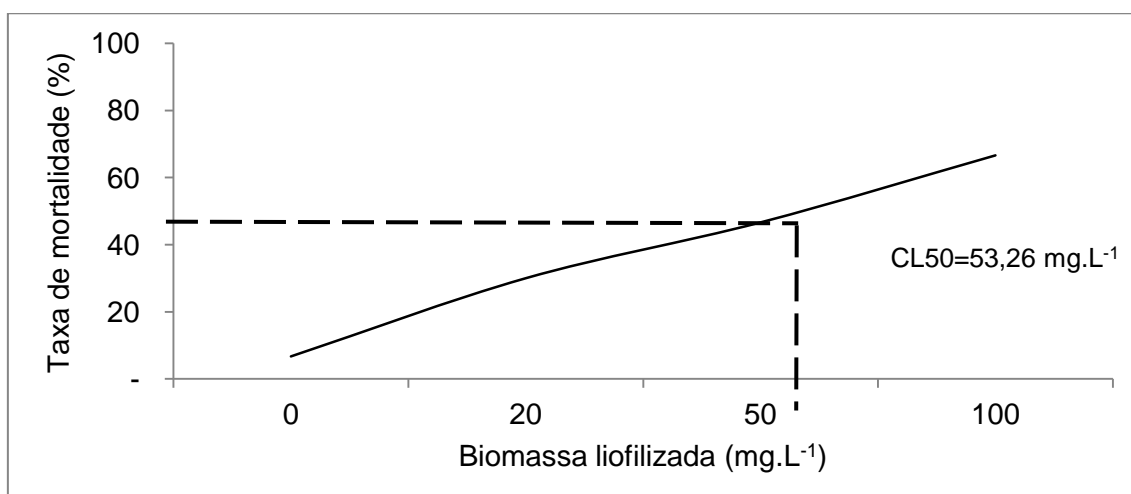


Figura 11. Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação de seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

Os resultados dos ensaios preliminares com as amostras provenientes de P2 indicaram que no período seco a presença da diatomácea *Thalassiosira* sp. como dominante (59%) em conjunto com a picocianobactéria *Synechocystis aquatilis* (14%), seguida por *Planktothrix* sp. (13%) (Figura 13 e tabela 3) apresentaram efeito mais pronunciado sobre a mortalidade de *P. caudatum* a partir da concentração de 20 mg.L⁻¹, após 8 horas de exposição (figura 14), porém a taxa de mortalidade apresentada foi baixa, não foi possibilitando o cálculo da CL50-8h e com isso testes com maiores concentrações foram realizados.

Enquanto isso as amostras de P2-chuva demonstraram maior mortalidade aos *P. caudatum* quando comparados os resultados dos ensaios de exposição (tabela 4), onde foi possível o cálculo da CL50-8h de $99,99 \text{ mg.L}^{-1}$ de biomassa liofilizada, demonstrando assim o efeito dessa amostra sobre a população de *P. caudatum* é causada em maiores concentrações de biomassa ressuspensa. Cabe ressaltar que essa amostra apresentou dominância de cianobactérias tóxicas identificadas como *Aphanizomenon* sp. (49%) e *Planktothrix* sp. (16%) em relação às outras espécies fitoplanctônicas (Tabela 3).

As altas temperaturas da água registrada na campanha de chuva, assim como as elevadas incidências de luz estão diretamente ligados a alta densidade fitoplanctônica presente nas amostras referentes a este período (GOMES et al., 2009), assim como pode interferir na concentração de toxinas presentes no ambiente onde ocorreu a floração. Com isso, como mencionado, os resultados destes ensaios preliminares permitiram a escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios definitivos de modo a obter os valores e intervalos das concentrações letais para *P. caudatum*, quando expostos as amostras de culturas de cianobactérias e comunidade fitoplanctônica.

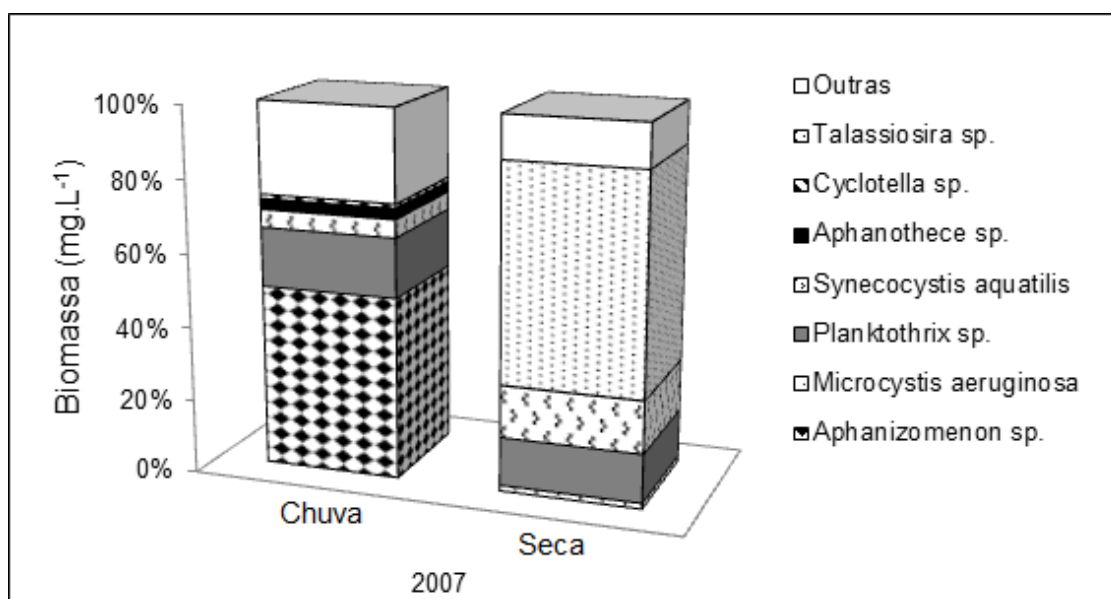


Figura 12. Dados de densidade fitoplanctônica do ponto 2 coletadas durante os períodos chuvoso e seco de 2007 na Lagoa de Jacarepaguá/RJ. Fonte: GOMES et al., 2009.

Tabela 3. Dominância fitoplanctônica presente nas amostras coletadas Lagoa de Jacarepaguá – RJ, no ponto 2, referentes às estações de seca e chuva no ano de 2007, (GOMES, et al., 2009).

Ponto 2			
Chuva		Seca	
Organismo	(%)	Organismo	(%)
<i>Aphanizomenon</i> sp.	49	<i>Thalassiosira</i> sp.	59
Outras	25	<i>S. aquatilis</i>	14
<i>Planktothrix</i> sp.	16	<i>Planktothrix</i> sp.	13

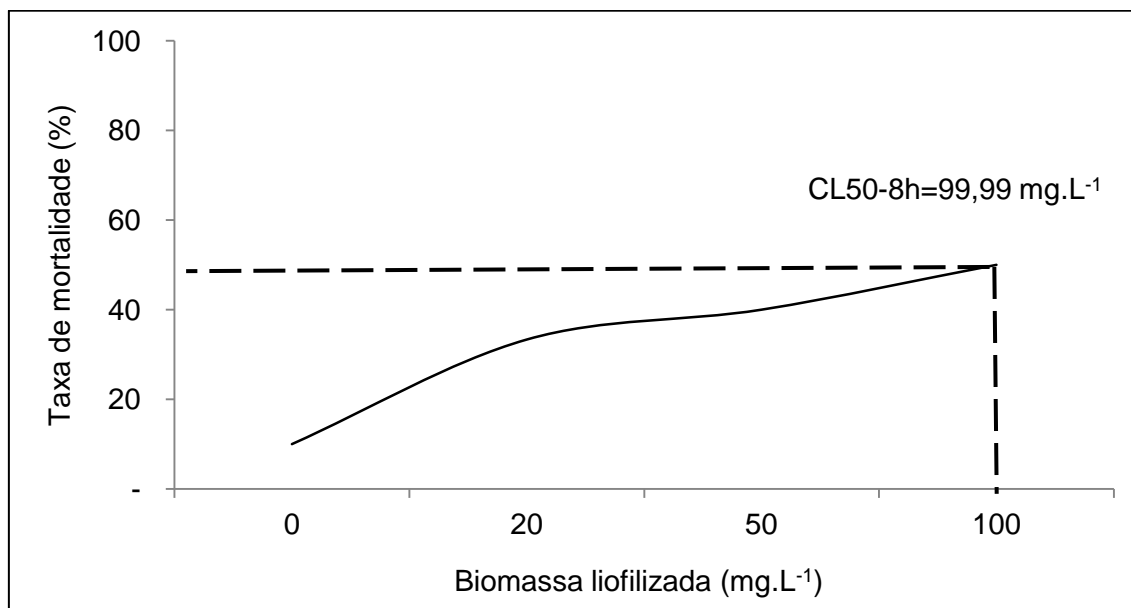


Figura 13. Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação de chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (49%), *Planktothrix* sp. (16%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

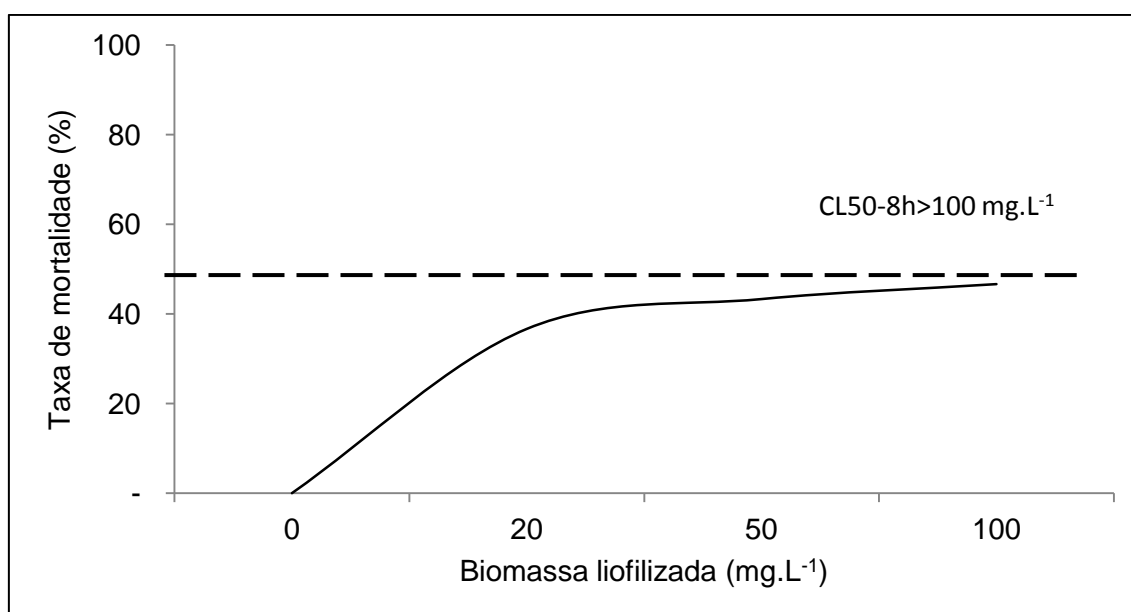


Figura 14. Ensaio preliminar expondo *P. caudatum* às concentrações de 20, 50 e 100 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação de seca,

com dominância de *Thalassiosira* sp. (59%), *S. aquatilis* (14%) e *Planktothrix* sp. (13%) coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

Tabela 4. Valores de concentração letal em mg.L^{-1} a 50% da população (CL50) de *Paramecium caudatum* expostos as amostras da comunidade fitoplanctônica coletados na lagoa de Jacarepaguá - RJ, no ano de 2007 em duas épocas do ano (períodos chuvoso e seco) em quatro diferentes tempos de exposição (2, 4, 6 e 8h), encontradas nos testes preliminares.

Tempo (horas)	Ponto 1		Ponto 2	
	Chuva (mg.L^{-1})	Seca (mg.L^{-1})	Chuva (mg.L^{-1})	Seca (mg.L^{-1})
2	-	73,50	-	-
4	-	53,90	-	-
6	99,99	45,62	-	-
8	35,98	53,16	99,99	-

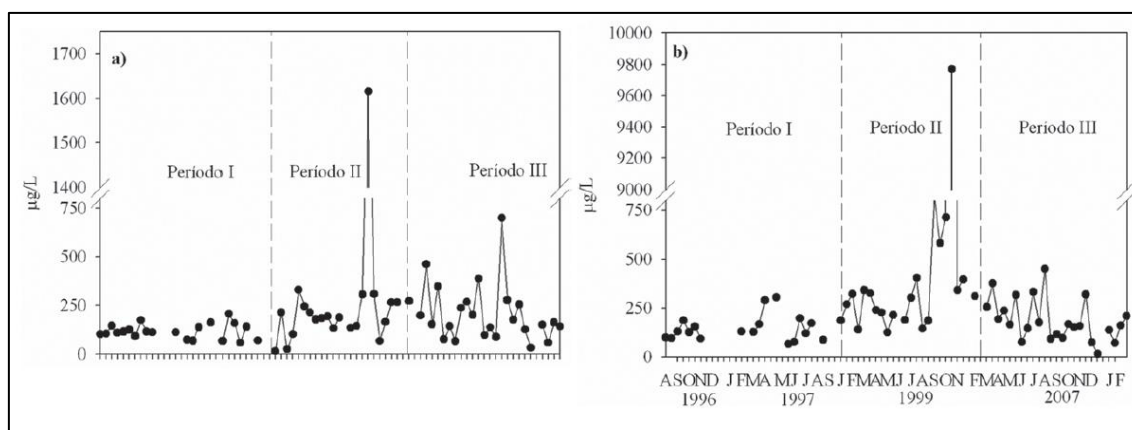


Figura 15. Concentração de clorofila-a, nos pontos 1 (a) e 2 (b), na lagoa de Jacarepaguá-RJ, onde PIII corresponde ao período estudado de fevereiro de 2007 a janeiro de 2008. Fonte: GOMES et al. 2009.

5.2.2. Ensaios definitivos

5.2.2.1. Ensaios com as cepas liofilizadas de cianobactérias produtora e não produtora de MC-LR

Foram realizados 2 ensaios, onde os *P. caudatum* foram expostos às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L^{-1} no primeiro e no segundo às de 50, 100, 500, 750 e 1.000 mg.L^{-1} massa celular liofilizada das cepas produtora, MIRS-04 e não produtora, NPCD-1 de MCs com o intuito de conhecer a CL50 destas cianobactérias sobre os *Paramecium caudatum*.

Os dois ensaios com as cepas liofilizadas com novos valores para conhecer-se a CL50. Os resultados indicaram um efeito tóxico maior para *P.*

caudatum quando exposto a cepa não produtora de MCs (NPCD-1) quando comparado à cepa produtora (MIRS-04).

No primeiro ensaio realizado com as cepas, NPCD-1 apresentou a CL50-8h de 48,13 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada sobre a população de *P. caudatum*, enquanto que MIRS-04 apresentou este efeito na concentração de 145,94 mg.L⁻¹ (figuras 16 e 17). Ambas as cepas já demonstram efeito sobre os organismos em baixas concentrações, onde em MIRS-04, a concentração de 10 mg.L⁻¹ de biomassa causou mortalidade a em torno de 35% da população após 8 horas de exposição.

A tabela 5 evidencia efeito de ambas as cepas a partir de 2 horas de exposição, onde NPCD-1 já demonstra maior toxicidade sobre os organismos, com CL50-2h de 103,53 mg.L⁻¹ de biomassa enquanto que MIRS-04 apresentou CL50-2h de 195,80 mg.L⁻¹. Portanto, mesmo não contendo MCs, como já evidenciado nos ensaios preliminares, esta cepa contém outros metabólitos secundários cujo efeito em *P. caudatum* foi maior.

Com o intuito de comprovar o maior efeito de NPCD-1 em relação à MIRS-04, os organismos foram expostos a concentrações maiores ultrapassando as encontradas em ambientes naturais hipereutróficos, os quais, segundo Meriluoto et al. (2017), geralmente apresentam em torno de 400 mg.L⁻¹ de massa celular algal.

Os resultados dos ensaios 2 para ambas as cepas (figuras 18 e 19), fortaleceram a resposta de *P. caudatum* indicando que para NPCD-01 este organismo foi mais sensível, uma vez que os dados indicaram para MIRS-04 valores de CL50 estão acima de 100 mg.L⁻¹ de massa celular liofilizada (163,60 mg.L⁻¹) em 8 horas de exposição, e para NPCD-1 ao redor de 50 mg.L⁻¹ (61,56 mg.L⁻¹) em 2 horas de exposição.

Para o segundo ensaio, NPCD-1 causou letalidade a 77% da população na concentração de 50 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada, reforçando assim os resultados do primeiro ensaio e não possibilitando o cálculo da CL50 em 8 horas de exposição.

Em relação à letalidade total (100%), concentrações acima de 200 mg.L⁻¹ para a cepa não produtora (NPCD-01) e 500 mg.L⁻¹ de biomassa para a cepa produtora de MCs (MIRS-01) provocam total extinção da população de *P. caudatum*.

Silva (2006) realizou a caracterização molecular de *Microcystis* sp. da linhagem NPCD-1 e encontrou por meio de sequenciamento genético a capacidade desta cepa produzir alguns peptídeos capazes de apresentar efeitos tóxicos e Batista (2013b) quantificou baixas concentrações de MCs nesta mesma cepa.

Araújo (2009) realizou ensaios de exposição aguda em 24 horas, utilizando como organismo teste o *P. caudatum*, exposto a cepas produtoras e não produtoras de MCs. Os resultados encontrados pela autora foram similares ao do presente trabalho, ou seja, maior sensibilidade de *P. caudatum* a cepa não produtora de MCs, comparada com a produtora.

Cabe ressaltar que todas as amostras destes ensaios, ou seja, as soluções com as devidas concentrações de ambos as cepas foram armazenadas para posterior quantificação de MCs e seus derivados. Acredita-se que estas informações serão de extrema importância de modo a fornecer maior robustez e complementar os resultados apresentados na presente dissertação.

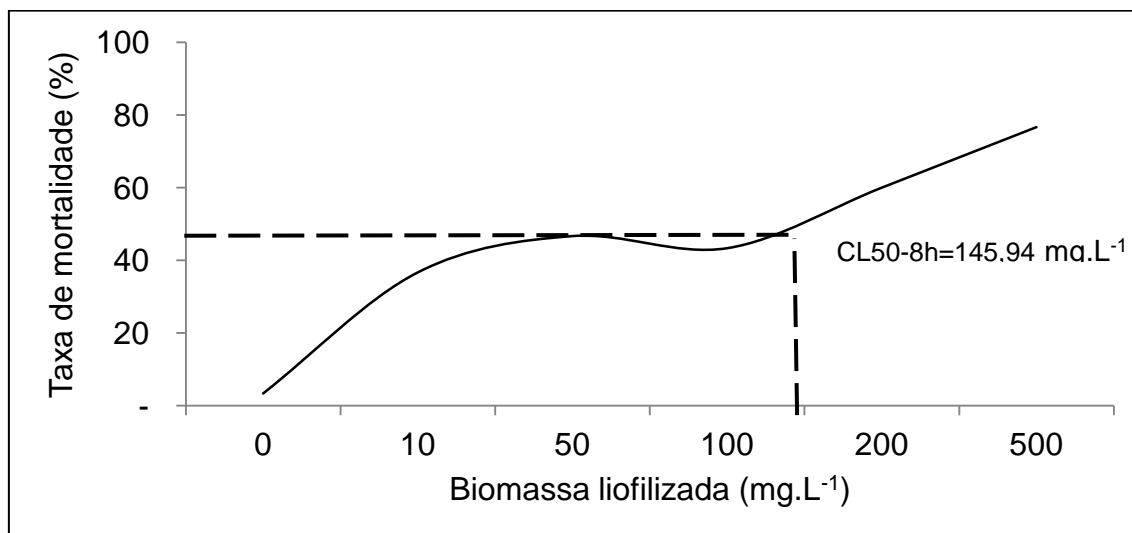


Figura 16. Exposição aguda de 8h de *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR.

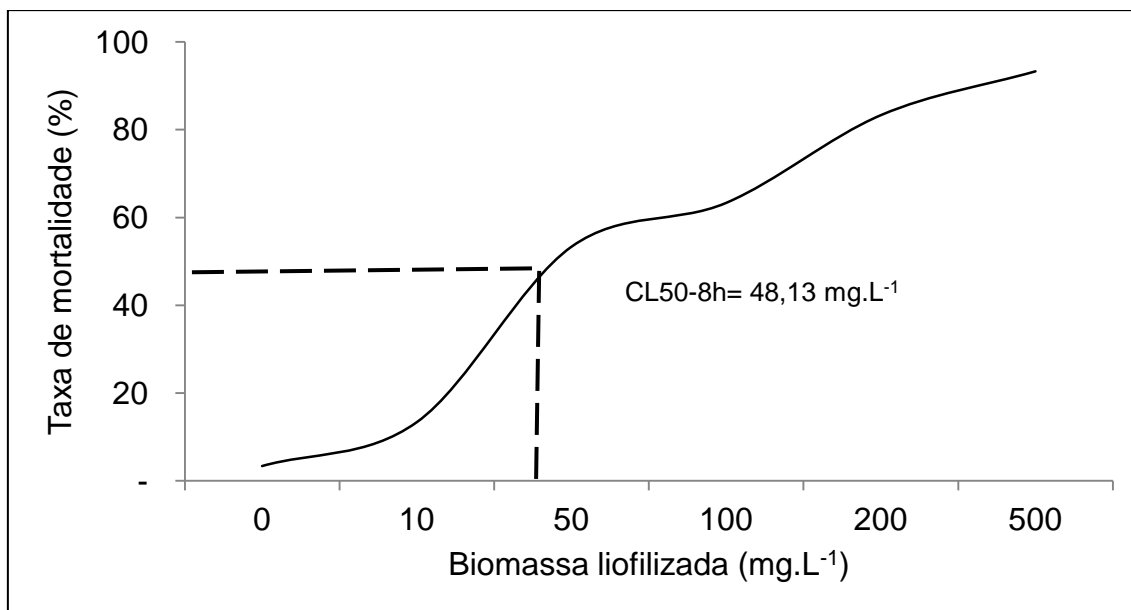


Figura 17. Exposição aguda de 8 horas de *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ de extrato biomassa liofilizada de *Microcystis sp.* (NPCD-1), não produtora de MC-LR.

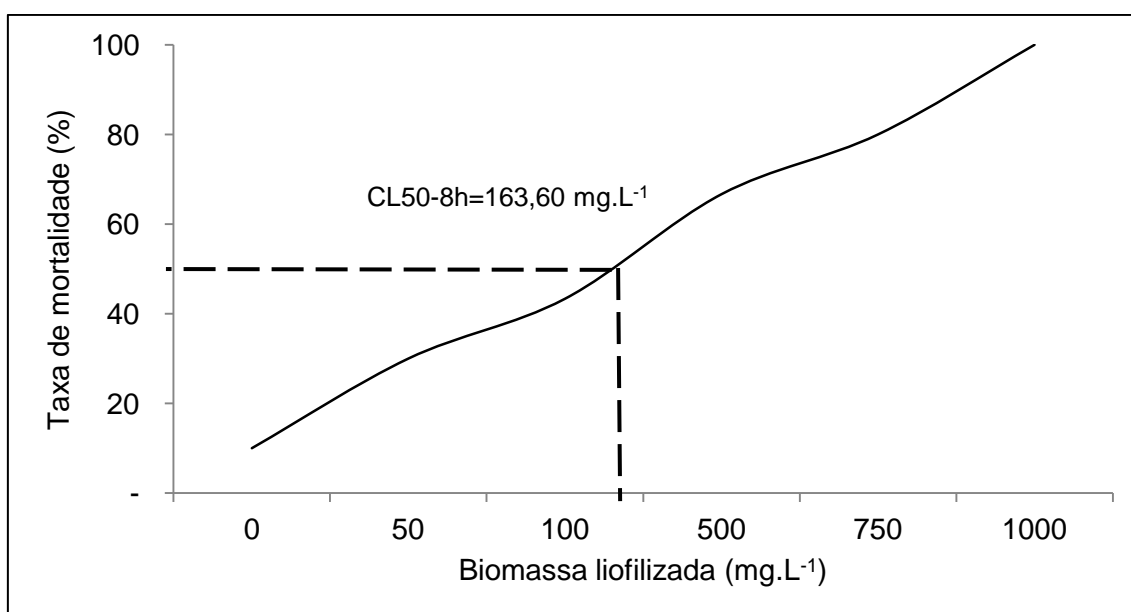


Figura 18. Exposição aguda de 8 horas *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1.000 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *M. wessemberg* (MIRS-04), produtora de MC-LR

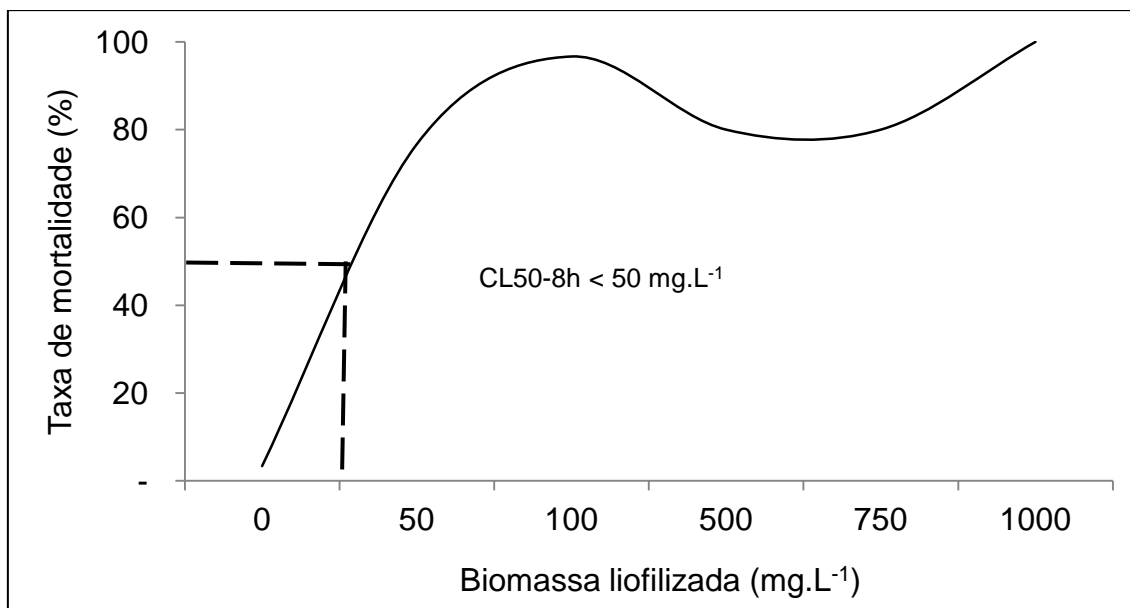


Figura 19. Exposição aguda de *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1.000 mg.L⁻¹ de biomassa liofilizada de *Microcystis* sp. (NPCD-1), não produtora de MC-LR.

Tabela 5. Valores de concentração letal em mg.L⁻¹ a 50% da população (CL50) de *Paramecium caudatum* expostos as amostras de cepas de cianobactérias produtoras (MIRS-04: *Microcystis wessemberg*) e não produtoras (NPCD-1: *Microcystis* sp.) de MCs, liofilizadas em diferentes tempos de exposição (2, 4, 6 e 8h).

Tempo (horas)	MIRS-04 (mg.L ⁻¹)		NPCD-1 (mg.L ⁻¹)	
	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2
2	195,80	391,47	103,53	61,56
4	231,77	318,60	77,61	-
6	171,54	207,71	73,88	-
8	145,94	163,60	48,13	-

5.2.2.2. Ensaio com as amostras liofilizadas da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Jacarepaguá/RJ.

As amostras coletadas no período chuvoso referentes aos pontos 1 e 2, em GOMES et al. (2009), apresentaram efeitos agudos na ordem decrescente conforme o tempo de exposição, ou seja: maiores valores de CL50 foram encontrados para o menor tempo (2h) para ambos os pontos (Tabela 6, Figuras 20 e 21). Como já mencionada tais amostras possuem dominância de *Aphanizomenon* sp, espécie é conhecida como produtora das cianotoxinas cilindrospermopsina, anatoxina a, saxitoxina e β -Methylamino-L-alanine (BMAA). BMAA é um aminoácido não proteínico de ação neurológica (EPA, 2015).

Porém ao se comparar ambos os pontos, P1, além de *Aphanizomenon sp*, também possui *Microcystis sp*, uma espécie produtora de MCs (MOLICA; AZEVEDO, 2009). O resultado desta composição provocou efeito agudo mais pronunciado sobre *P. caudatum* conferindo valores menores de CL50 (Tabela 2).

No entanto os valores de CL50 para *P. caudatum* expostos a diferentes tempos de exposição às amostras coletadas no período seco, não apresentaram a tendência decrescente de valores, pois para cada tempo de exposição, houve um resultado diferente de CL50 (Tabela 6, Figuras 22 e 23). Cabe ressaltar que P1 apresentou dominância de 80% de *Oscillatoria sp.* e o ponto 2 59% da diatomácea *Thalassiosira sp.* e os efeitos agudos a *P. caudatum* foram mais pronunciados quando expostos a diatomácea, comparado a dominância de *Oscillatoria sp.* (para os dois ensaios - Figuras 23 e 24).

Pode-se inferir a amostra com dominância da cianobactéria possua concentrações de compostos, tais como os lipopolissacarídeos, em concentrações mínimas, as quais refletiram em valores de CL50 muito altos (Swanson-Mungerson et al, 2017).

É importante ressaltar que Barsanti e Gualtieri (2006) expõem que a diatomácea da espécie *Thalassiosira rotula* é capaz de produzir alguns aldeídos polinsaturados tóxicos, os quais podem causar apoptose celular na fase embrionária de diversos organismos como copépodos e ouriços do mar, por exemplo.

Outro ponto importante para se ressaltar acerca das diatomáceas é a presença da frústula, uma parede celular bipartida formada por sílica orgânica, a qual pode variar em quantidade de acordo com as espécies e condições ambientais, onde a incidência solar e a espessura da parede celular são razões diretamente proporcionais (ZHANG et al., 2017). Estas estruturas têm como uma de suas funções a proteção contra herbivoria, onde, segundo Raven e Waite (2004), explanam acerca da indigestibilidade de diatomáceas por alguns organismos que se alimentam de fitoplâncton, o que pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho sobre *P. caudatum*.

Além disso, P2 no período seco apresentou 14% de sua biomassa formada por *Synechocystis sp.* e 13% de *Planktothrix sp.* ambas cianobactérias

capazes de produzir diversas toxinas e mesmo em baixa proporção, quando comparada à dominante, pode ocasionar na efeitos agudos tóxicos sobre os organismos testados. Com isso, essa amostra apresentou CL50-8h de 186,61 mg.L⁻¹ sobre os organismos expostos, mostrando maior efeito sobre *P. caudatum* quando comparada à amostra de chuva deste ponto.

Em relação aos dados abióticos, P2-seca apresentou uma concentração de clorofila em torno de 450 µg.L⁻¹, o que demonstra uma alta biomassa algal quando comparada à amostra do período de seca, onde há em torno de 350 µg.L⁻¹ de clorofila-a (Figura 15).

Tabela 6. Valores de concentração letal em mg.L⁻¹ a 50% da população (CL50) de *Paramecium caudatum* expostos as amostras da comunidade fitoplanctônica coletados na lagoa de Jacarepaguá - RJ, no ano de 2007 em duas épocas do ano (períodos chuvoso e seco) em diferentes tempos de exposição (2, 4, 6 e 8h).

Tempo (horas)	Ponto 1		Ponto 2	
	Chuva (mg.L ⁻¹)	Seca (mg.L ⁻¹)	Chuva (mg.L ⁻¹)	Seca (mg.L ⁻¹)
2	115,14	191,94	-	-
4	88,33	99,30	233,85	181,14
6	87,81	157,45	125,89	93,76
8	39,76	354,60	70,78	186,61

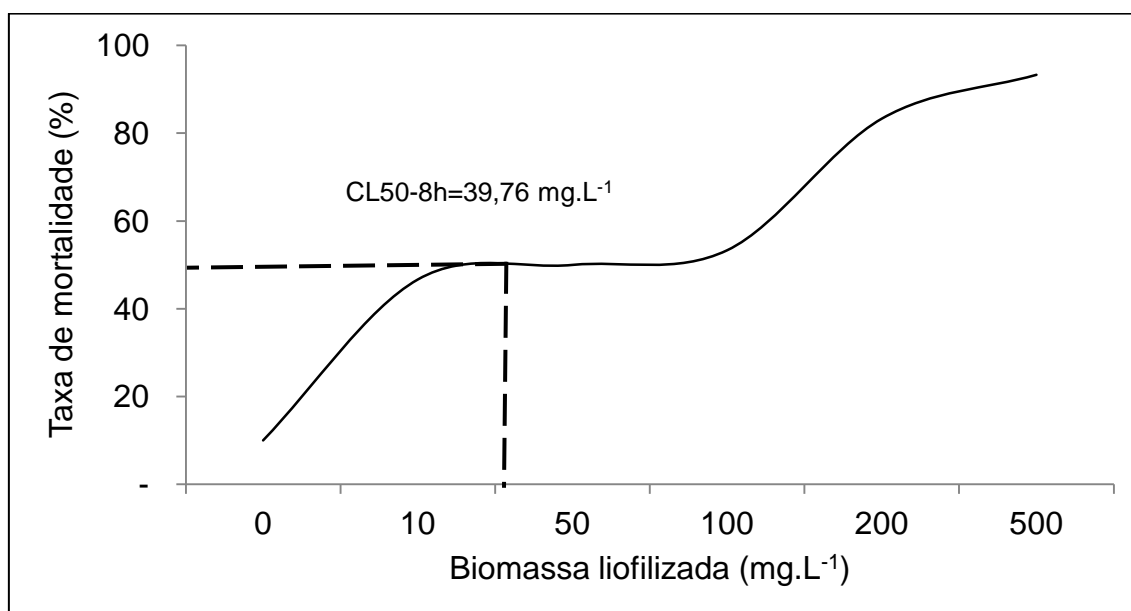


Figura 20. Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (55%), *M. aeruginosa* (32%) e *Planktothrix* sp. (8%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

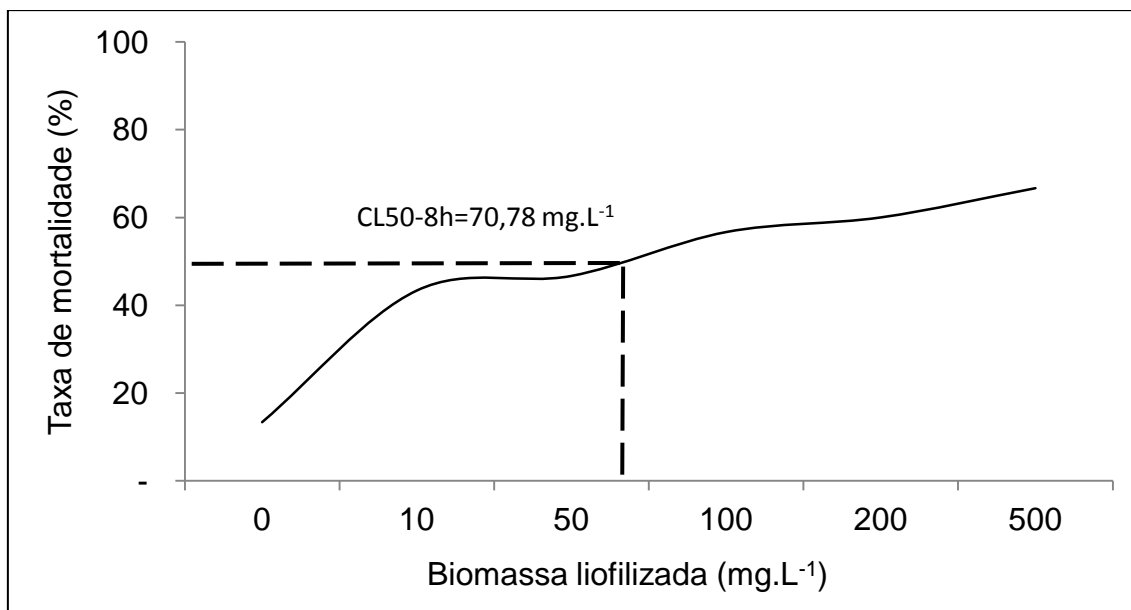


Figura 21. Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação chuvosa, com dominância de *Aphanizomenon* sp. (49%), *Planktothrix* sp. (16%) e outras não identificadas (25%) coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

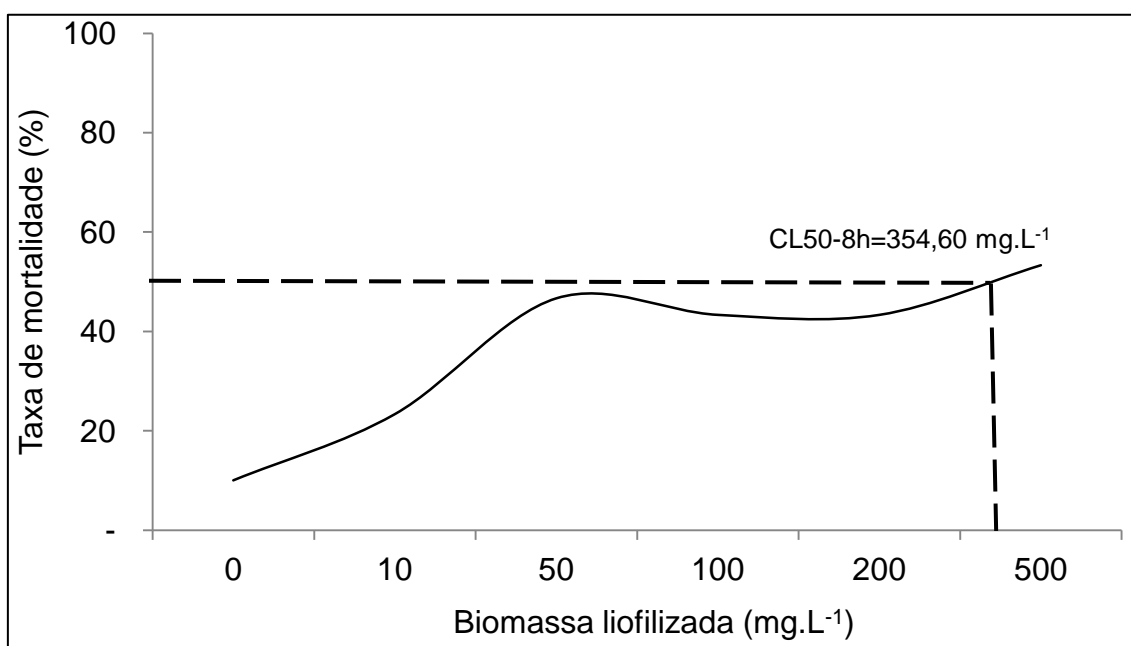


Figura 22. Ensaio 1 expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007

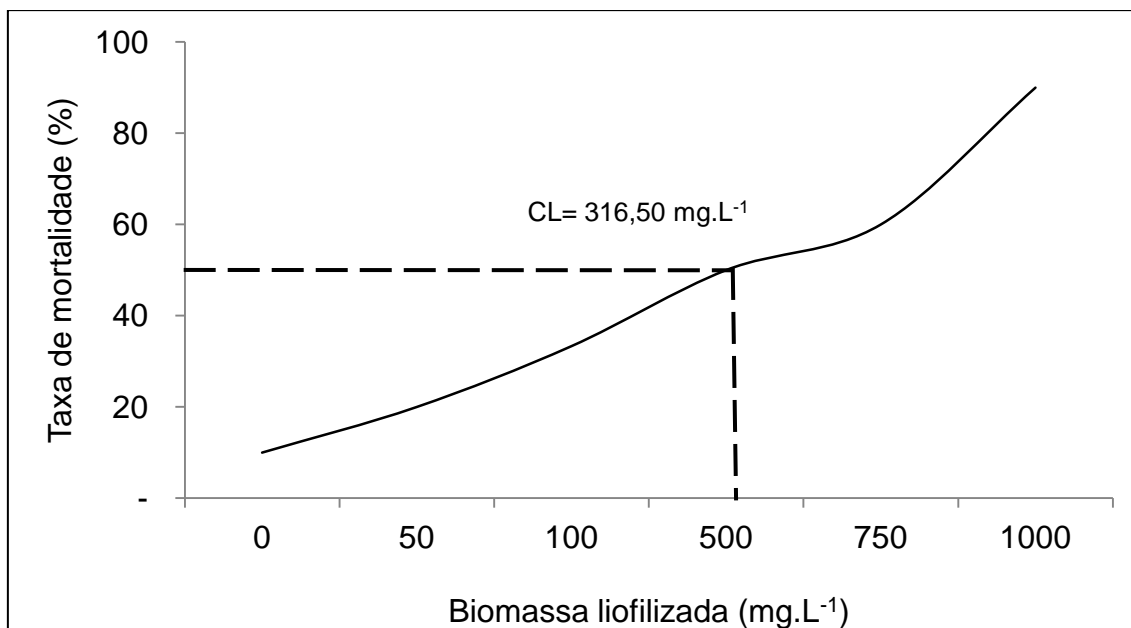


Figura 23. Ensaio 2 expondo *P. caudatum* às concentrações de 50, 100, 500, 750 e 1000 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 1, na estação seca, com dominância de *Oscillatoria* (88%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

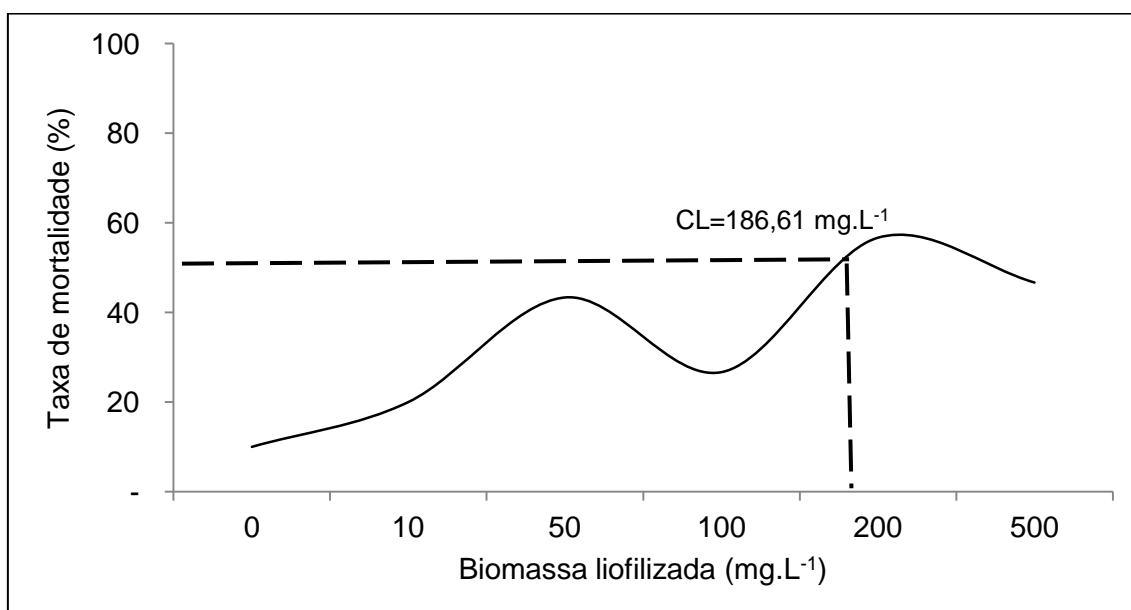


Figura 24. Ensaio expondo *P. caudatum* às concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 mg.L⁻¹ após 8h de exposição, a partir da amostra liofilizada, referente ao ponto 2, na estação seca, com dominância de *S. aquatilis* (14%), *Thalassiosira* sp. (59%) e *Planktothrix* sp. (13%), coletada na Lagoa de Jacarepaguá-RJ em 2007.

Como já mencionado, as devidas amostras de todos os ensaios acima apresentados encontram-se armazenadas para a devida quantificação das cianotoxinas e seus derivados, de modo a complementar os resultados apresentados na presente dissertação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Paramecium caudatum* se mostrou de fácil cultivo e manutenção em laboratório somente com água mineral e arroz com casca macerado, pois nestas condições existirá a fonte de bactérias necessárias para sua alimentação;
- *P. caudatum* pode ser um bom organismo-teste para avaliar ambientes eutrofizados, porém faz-se necessário a realização de ensaios com substâncias de referência, com enfoque dos compostos nitrogenados e fosfatados;
- Os resultados apresentados no presente estudo sinalizaram que *P. caudatum* após exposição a extratos semi-purificados de cianobactérias produtoras e não produtoras de MCs, bem como as amostras da comunidade fitoplanctônica pode indicar o início de processos de bioacumulação ou biomagnificação de cianotoxinas, podendo prejudicar toda a teia trófica, o que poderá ser investigado.
- É necessária a quantificação das toxinas presentes nas amostras testadas a fim de aprimorar os testes utilizando os *Paramecium caudatum*, de modo que haja uma maior precisão nas faixas das CL50 destas cianotoxinas sobre estes organismos, para assim padronizar protocolos de análise ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. S. **Avaliação dos efeitos de um extrato bruto de cianobactéria contendo microcistina sobre o desempenho reprodutivo e a embriofetotoxicidade de ratos.** 2013. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2013.

AMANCHI, N. R.; HUSSAIN, M. M. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. Hyderabad, India. **Journal of Environmental Biology**, p. 603-607. 2010.

ARAUJO, L. M. R. **Estudos das interações fitoplâncton – protozooplâncton no reservatório de Barra Bonita, SP, com ênfase na toxicidade de microcistinas.** 2009. 124f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2009.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAW, G. K. Human intoxication by *Microcystis* during renal dialysis treatment in Caruaru – Brasil. **Toxicology**. Rio de Janeiro, n. 181, p. 441-446. 2002.

BAGATINI, I.L; SPÍNOLA, A.L.G; PERES, B.M; MANSANO, A.S; RODRIGUES, M.A.A; BATALHA, M.A.P.L; DE LUCCA, J.V; GOLDINHO, M.J; MATSUMURA TUNDISI, .T; REGALI-SELEGHIM, M.H. Protozooplankton and its relationship with environmental conditions in 13 water bodies of the Mogi-Guaçu basin - SP, Brazil. **Biota Neotropica**. Campinas, v.13, n.4, p.152-163. 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.** Italy: CRC Press.Taylor & Francis Group. 303 p. p.285-288. 2006.

BATISTA, A. A.; MEIRELLES, A. C. M.; ARAUJO NETO, J. R.; ANDRADE, E. M. PALÁCIO, H. A. Q. parâmetros interferentes na eutrofização das águas superficiais do açude Orós, Ceará. **Revista Caatinga**. Fortaleza v. 26, n. 2, p. 1-8. 2013a.

BATISTA, A. D.; SUZUKI, L. Y.; KURODA, E. K. Avaliação da toxicidade de extratos de cepas de cianobactérias com diferentes organismos-teste. **Periódico Eletrônico do IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**. São Paulo, v. 9, v. 11, p. 186-201. 2013b.

BEGON, M., TOWNSEND, C. R., HARPER, J. L. **Ecologia: De indivíduos a sistemas.** 4. ed. São Paulo: Artmed® Editora S. A., 740. p.p. 633-658. 2008.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. **Freshwater algae: Identification, Enumeration and use as bioindicators.** 2. ed. Reino Unido: Wiley Blackwell, 275. p. p. 4-17. 2015.

BLISS, C.I. The Method of Probits. **Science**, Estados Unidos da América, v.79, p.38-39. 1934a.

BLISS, C.I. The Method of Probits a Correction. **Science**, Estados Unidos da América, v.79, p.409-410.1934b.

BLISS, C.I. The calculator of the dosage-mortality curve. **Annals of Applied Biology**, Reino Unido, v.22, p. 134-167. 1935.

BORRELY, S.I. **Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixes de elétrons, avaliada com a espécie *V. fischeri*, *D. similis* e *P. reticulata***. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.924/2011, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.

BURATTI, F. M.; MANGANELLI, M. VICHI, S.; STEFANELLI, M. SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of Toxicology**. Heidelberg, n. 91, p. 1049-1130. 2017.

CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 3, p. 1710-1789, 1989.

CARMICHAEL, W.W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**. Ohio, v.7, n. 5, p. 1393-1407. 2001.

CHEN, J.; XIE, P.; LI, L.; XU, J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. **Toxicology Science**. China, v. 108, n. 1, p. 81-89. 2009.

COSTA, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas. **Iheringia. Série Botânica**. Porto Alegre, n. 45, p. 69-74. 1994.

DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**. Grã Bretanha, v. 36, n. 7, p. 953-962. 1998.

DITTMANN, E., FEWER, D., NEILAN, B.A. Cyanobacterial Toxins: Biosynthetic Routes and Evolutionary Roots. **FEMS: Microbiology Review**. Alemanha, v. 37, p. 23-43. 2013.

DIVE, D.; PERSOONE, G. Protozoa as test organisms in marine ecotoxicology: Luxury or necessity? **Ecotoxicological Testing for the Marine Environment**. Bredene, Bélgica, v. 1, p. 281-305. 1984.

DÖRR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. *Microcystis* in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**. Rio de Janeiro, n. 56, p. 1247-1256. 2010.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2015). **Cyanobacteria/Cyanotoxins**. Disponível em: < <https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanobacteriacyanotoxins>>. Acesso em 11 de abril de 2018.

FALCONER, I. R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. **Algal Toxins in seafood and drinking water**. Australia: University of Adelaide, p. 177-178. 1993.

FÉRARD, J. P.; BLAISE, C. **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. 1. ed. New York: Springer Reference, 1222 p. p. 909-916. 2013.

FERNANDES, K. A. **Efeitos agudos e alterações morfológicas em larvas de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) expostas à extratos de cianobactérias produtora e não produtora de microcistina-LR**. 2016. 56f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Universidade Federal de Itajubá). Itajubá. 2016.

FERRÃO-FILHO, A. S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 272-312. 2009.

FRANCY, D. S.; GRAHAM, J. L.; STELZER, E. A.; ECKER, C. D.; BRADY, A. M. G.; STRUFFOLINO, P. LOFTIN, P. Water Quality, Cyanobacteria, and Environmental Factors and Their Relations to Microcystin Concentrations for Use in Predictive Models at Ohio Lake Erie and Inland Lake Recreational Sites, **2013–14. United States Geological Survey: Science for Changing World**. Virginia, p.58. 2015.

GER, K. A.; URRUTIA-CORDEIRO, P.; FROST, P. C.; HANSSON, L. A.; SARNELLE, O.; WILSON, A. E.; LÜRLING, M. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. **Harmful Algae**. Rio Grande do Norte, n. 54, p. 128-144. 2016.

GHIGLIONE, J. F.; MARTIN-LAURENT, F.; PESCE, S. Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. **Environmental Science and Pollution Research**. Berlim, n. 23, p. 3981-3983. 2016.

GOMES, A. M. A.; SAMPAIO, P. L.; FERRÃO-FILHO, A. S.; MAGALHÃES, V. F.; MARINHO, M. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SANTOS, V. B.; DOMINGOS, P.; AZEVEDO, S. M. F. O. Florações de cianobactérias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para saúde humana. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 329-345. 2009.

GOMIERO, A.; DAGNINO, A.; NASCI, C.; VIARENGO, A. The use of protozoa in ecotoxicology: Application of multiple endpoint tests of the ciliate *E. crassus*

for the evaluation of sediment quality in coastal marine ecosystems. Ancona, Italy. **Science of the Total Environment**. n. 442, p. 534-544. 2013.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**. Bozeman, v. 11, n. 7, p. 714-719. 1977.

HANSEN, L. R.; KRISTIANSEN, J.; RASMUSSEN, J. P. Potential toxicity of the freshwater *Chrysochmmulina* species *C. parva* (Prymnesiophyceae). **Hydrobiologia**. Belgica, v. 287, p. 157-159. 1994.

HERRERA, N.; PALACIO, J.; ECHEVERRI, F.; FERRÃO-FILHO, A. Effects of a cyanobacterial bloom sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. **Toxicology Reports**. Brazil, n. 1, p. 909-914. 2014.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JUNIOR, G. A.; CAIRNS JUNIOR, J. **Handbook of Ecotoxicology**. 2 ed. Florida. 2003. 120 p. p. 20-38. 2003.

HUTCHINSON, G. E. **A Treatise on Limnology: Geography Physics and Chemistry**. v.1, New York: John Wiley & Sons. 1015p. 1957.

KLAASSIN, C. D. Casarett and Doull's. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 8. ed. Kansas: McGraw-Hill Education, 2013. p. 49-122. 2013.

LARSON, D.; AHLGREN, G.; WILLÉN, E. Bioaccumulation of microcystins in the food web: a field study of four Swedish lakes. **Inland Waters**. Suécia, v. 4, n. 1, p. 91-104. 2014.

LEAL, A. C.; SOARES, M. C. P. Hepatotoxicity of the microcystin cyanotoxin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Belém, n. 37, p. 84-89. 2004.

LI, G.; YAN, W.; CAI, F.; LI, C.; CHEN, N.; WANG, J. Spatial learning and memory impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR. **Environmental Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 261-268. 2012.

LYNN, D. H. **The ciliate protozoa: Characterization, classification and guide to the literature**. 3. ed. Canadá: Springer. p. 89-120. 2008.

MACEDO, C. F.; SIPAUBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e Qualidade da Água na Piscicultura: Consequências e Recomendações. Jaboticabal. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 36, n. 2, p. 149-163. 2010.

MADONI, P.; ROMEO, M. G. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution**. Parma, Itália, n. 141, p. 1-7. 2006.

MADONI, P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. **Environmental Pollution**. Parma, Italia, n. 109, p. 53-59. 2000.

MADONI, P. Ciliated protozoan communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of Po River (northern Italy). **Hydrobiologia**, Irlanda, v.41, p.55-69. 2005.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 335-381. 2008.

MARINHO, M. M.; MOLICA, R. J. R.; JARDIM, F. A.; HUSZAR, V. L. M. *Cylindrospermopsis* (*Cyanobacteria*) em ecossistemas brasileiros: Um novo desafio para o gerenciamento aquático. **Lições de Limnologia**. São Carlos, p. 325-339. 2005.

McDERMOTT, C. M.; NHO, C. W.; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**. Grã-Bretanha, v. 36, n. 12, p. 1981-1996. 1998.

MERILUOTO, J.; SPOOF, L.; CODD, G. A.; **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**. (eds). UK: John Wiley & Sons: West Sussex. 2017.

MIRANDA, M. M. P.; MARTINS, N. F. Otimização do cultivo do *Paramecium caudatum* para estudo em testes de toxicidade. **Revista Verde**. Mossoró, RN, v. 7, n. 4, p. 50-55. 2012.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**. Garanhuns, PE, v. 13, n. 2, p. 229-246. 2009.

NEWMAN, M.C. **Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution**. 4. ed. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 633 p. 2015.

OBEREMM, A.; BECKER, J. CODD, G. A.; STEINBERG, C. Effects of Cyanobacterial Toxins and Aqueous Crude Extracts of Cyanobacteria on the Development of Fish and Amphibians. **Environmental Toxicology**. Alemanha, v. 14, n. 1, p. 77-88. 1999.

PAERL, H. W., GARDNER, W. S., HAVENS, K. E., JOYNER, A. R., McCARTHY, S. E. N., QIN, B., SCOTT, J. D. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. **Harmful Algae**. EUA, n. 54, p. 213-222. 2016.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**. EUA, v. 320, n. 5872, p. 57-58. 2008.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. **Marine Drugs**. Australia, v. 8, p. 1650-1680. 2010.

PAES, T. A. S. V.; COSTA, I. A. S.; SILVA, A. P. C.; SANT'ANNA, E. M. Z. Can microcystins affect zooplankton structure community in tropical eutrophic reservoirs? **Brazilian Journal of Biology**. Brazil, v. 76, n. 2, p. 450-460. 2016.

PAULI, W.; JAX, K.; BERGER, S. Protozoa in Wastewater Treatment: Function and importance. **Biodegradation and Persistence**. Berlim, p. 203-252. 2001.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISNER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in hemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**. Recife, v. 352, p. 21-26. 1998.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M. R.; WOOD, S. A.; CARY, S. C.; HAMILTON, D. P.; HOLLAND, P. T. Further characterization of glycine-containing microcystins from the McMurdo dry valleys of Antarctica. **Toxins**. Nova Zelandia, n. 7, p. 493-515. 2015.

RANSOM, R. E.; NERARD, T. A.; MEIER, P. G. Acute toxicity of some bluegreen algae to the protozoan *Paramecium caudatum*. **Journal of Phycology**. Michigan, n. 1, v. 14, p. 114-116. 1978.

RAVEN, J. A.; WAITE, A. M. The evolution of silicification in diatoms: Inescapable sinking and sinking as escape? **New Phytologist**. Australia, n. 162, p. 45-61. 2004.

REGALI-SELEGHIM, M. H. 2006. Taxonomia de protozoários. In Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus. (J.L. Azevedo & R.F. Vazoller, coord.). 50p. 2006.

SANT'ANNA, C.L; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**. São Paulo, v. 126, p. 249-263. 2008.

SARVESTANI, A. N.; SHAMLOO, A.; AHMADIAN, M. T. Simulation of *paramecium* chemotaxis exposed to calcium gradients. **Cell Biochem Biophys**. New York, n. 74, p. 241-252. 2016.

SMUTNÁ, M.; BABICA, P.; JARQUE, S.; HILSCHEOVÁ, K.; MARSÁLEK, B.; HAEBBA, M.; BLÁHA, L. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex 32 cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. **Toxicon**. Líbia, n. 79, p. 11-18. 2014.

SILVA, C. S. P. **Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais**. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências, área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2006.

SU, Y.; LI, L.; HOU, J.; WU, N.; LI, W.; LI, G. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with their productive endocrine system of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**. China, n. 175, p. 205-212. 2016.

SVIRCEV, Z.; DROBAC, D.; TOKODI, N. MIJOVIC, B.; CODD, G. A.; MERILUOTO, J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. **Archives of Toxicology**. Berlim, v. 91, p. 621-650. 2017.

SWANSON-MUNGERSON, M.; INCROCCI, R.; SUBRAMANIAM,V.; WILLIAMS, P.; HALL, M. L.; MAYER, A. M. S. Effects of cyanobacteria *Oscillatoria* sp. lipopolysaccharide on B cell activation and Toll-like receptor 4 signaling. **Toxicology Letters**. Chicago, v. 275, p. 101-107. 2017.

TOPOROWSKA, M.; PAWLIK-SKOWROŃSKA, B.; KALINOWSKA, R. Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-an on benthic larvae of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae). **European Journal of Entomology**. Polônia, v. 111, n. 1, p. 83-90. 2014.

TORGAN, L. C. **Identificação de microalga (Chloroficeae – Chlorococcales) do banco de cultivo do Departamento de Ecologia/UFRGS**. Porto Alegre, fundação zoobotânica, RS, 2002, Relatório técnico.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed Editora SA, Copyright. p.164-172. 2012.

TUCCI, C. E. M., HESPANHOL, I. & NETTO, O. M. C. Gestão da Água no Brasil. **UNESCO**. 156p. p. 42. 2001.

TUCCI, C. E. Águas urbanas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 97-112, 2008.

TUCCI, C. E. **Gestão de águas pluviais urbanas**. UNESCO. 192p. 2005.

TWAGILIMANA, L.; BOHATIER, J.; GROLIERE, C. A.; BONNEMOY, F.; SARGOS, D. A new low-cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum teres*: Culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. França, n. 41, p. 231-244. 1998.

VILAS BOAS, J. A. **Microeucariotos ciliados (Alveolata: Ciliophora) em um sistema lótico urbano neotropical e uso potencial em ensaios ecotoxicológicos**. 2016. 107f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Itajubá. Itajubá. 2016.

WARD C. J.; CODD, G. A. comparative toxicity of four microcystin of different hydrophobicity to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. **Journal of Applied Microbiology**. Escócia, v. 86, p. 874-882. 1999.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. *Microcystis* analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**. Dayton, n. 48, p. 627-640. 2006.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima. p.1-13.2006.

ZOHARY, T.; ROBERTS, R. D. Hyperscums and the population dynamics of *Mycrocystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**. Israel, v. 12, n. 2, p. 423-432. 1990.

ZHANG, S.; LIU, H.; LI, P. Effect of the silica content of diatoms on protozoan grazing. **Frontiers in Marine Science**. Hong Kong, v. 4, n. 202, p. 1-10. 2017.

ANEXO 1

➤ Composição das soluções estoque utilizadas na formulação do meio de cultivo.

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Solução A<ul style="list-style-type: none">○ NaNO_3: 8,5 mg.mL⁻¹○ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2,05 mg.mL⁻¹○ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,45 mg.mL⁻¹○ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,45 mg.mL⁻¹
• Solução B<ul style="list-style-type: none">○ K_2HPO_4: 8,7 mg.mL⁻¹ ou○ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 11,4 mg.mL⁻¹○ $\text{NA}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 17,8 mg.mL⁻¹ ou○ $\text{NA}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 13,3 mg.mL⁻¹ | <ul style="list-style-type: none">• Solução C<ul style="list-style-type: none">○ H_3PO_3: 24,8 mg.mL⁻¹○ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 13,9 mg.mL⁻¹○ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 10,8 mg.mL⁻¹○ ZnCl_2: 3,35 mg.mL⁻¹○ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,19 mg.mL⁻¹○ CuCl_2: 0,014 mg.mL⁻¹ ou○ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,018 mg.mL⁻¹
• Solução D<ul style="list-style-type: none">○ EDTA . Na₂ (Titrplex III): 18,6 mg.mL⁻¹ |
|---|---|

➤ Preparação do meio de cultivo:

- Em um recipiente estéril é adicionado 20,0 mL da Solução Estoque A, 2,0 mL da B, 0,10 mL da solução C e 0,40 mL da D, para cada litro de água destilada;
- O pH do meio deve estar entre os valores 7,0 e 8,0 o qual deverá ser calibrado com hidróxido de sódio;
- Após a calibração o meio é esterilizado em autoclave para posterior inoculação das cepas.