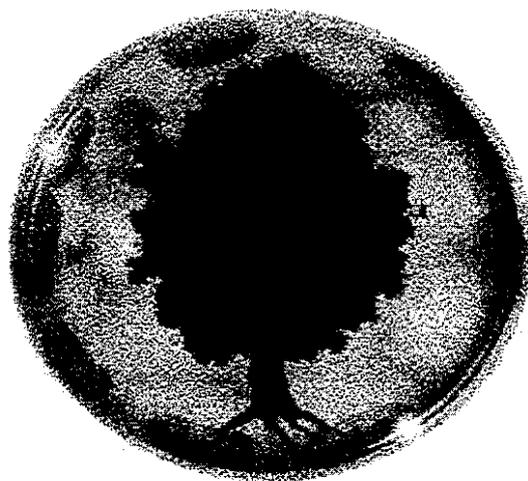


PATRÍCIA DOMINGOS

DOMINÂNCIA DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE
MICROCISTINAS NA LAGOA DE JACAREPAGUÁ (RJ)



PBV – UFRJ
2001

**DOMINÂNCIA DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE
MICROCISTINAS NA LAGOA DE JACAREPAGUÁ (RJ)**

PATRÍCIA DOMINGOS

**PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL
GRAU: DOUTORADO**

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. SANDRA MARIA FELICIANO O. AZEVEDO

Rio de Janeiro

2001

Aos meus queridos

Paulo, Pedro e Teresa,

A vocês dedico este trabalho por terem sido a verdadeira inspiração que me guiou nestes caminhos.

Com amor e carinho

DOMINÂNCIA DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE MICROCISTINAS NA LAGOA DE JACAREPAGUÁ (RJ)

PATRÍCIA DOMINGOS

Tese submetida ao corpo docente do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de doutor.

Orientação

Sandra M. O. Azevedo

Dra. Sandra Maria Feliciano O. Azevedo

Aprovada por:

Maria Célia Vilac

Dra. Maria Célia Vilac

Vera Lúcia de Moraes Huszar

Dra. Vera Lúcia de Moraes Huszar

Yocie Yoneshigue Valentim

Dra. Yocie Yoneshigue-Valentim

Dra. Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Revisora

Domingos, Patrícia

Dominância de Cianobactérias Produtoras de Microcistinas
na Lagoa de Jacarepaguá (RJ)

Patrícia Domingos. Rio de Janeiro: UFRJ/PBV, 2001.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PBV, 2001.

1. *Microcystis aeruginosa*, Cianobactérias, microcistinas, lagoa costeira.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO1

OBJETIVOS15

METODOLOGIA16

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I – Dominância de Cianobactérias em uma lagoa costeira tropical hipereutrófica (Lagoa de Jacarepaguá-RJ, Brasil).....24

CAPÍTULO II – Produção de microcistinas por uma floração de *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin em uma lagoa costeira tropical oligohalina (Lagoa de Jacarepaguá-RJ, Brasil)50

CAPÍTULO III – Crescimento e produção de microcistinas por *Microcystis aeruginosa*-NPLJ 37 em diferentes condições de salinidade e em competição com *Eichhornia crassipes* – macrófita aquática69

CONCLUSÕES93

BIBLIOGRAFIA97

ANEXO 1 – Diagrama dos Experimentos do Capítulo III108

ANEXO 2 - Trabalhos publicados no período de desenvolvimento da Tese.....111

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sandra Azevedo pela orientação e amizade.

À Profa. Dra. Vera Lúcia de Moraes Huszar pelo incentivo e cessão do microscópio invertido do Laboratório de Ficologia do Museu Nacional – UFRJ, onde foi realizada parte deste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Tenenbaum e à Profa. Dra. Maria Célia Villac do Laboratório de Fitoplâncton – UFRJ, que disponibilizaram o uso de equipamentos de microscopia de seu laboratório.

Às queridas companheiras do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – UFRJ, Karine Toso Rubim e Maria Elisângela Venâncio pela inestimável colaboração na fase experimental deste trabalho.

A Aloysio Ferrão-Filho pela companhia nas coleta de campo.

Aos colegas que integram a equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – UFRJ Ana Cláudia, Andréia, Elisângela, João Carlos, Marcelo, Raquel, Robson, Simone, Tatiani e Valéria pela agradável convivência, pela colaboração e amizade sinceras.

Às queridas Mariângela, Vera, Izabel, Graça, Lúcia, Ina, Edlamar, Catarina e Fernanda cujo convívio no Laboratório de Ficologia do Museu Nacional – UFRJ serviram de incentivo e estímulo.

Ao Dr. Luiz Otávio Azevedo pela colaboração nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Rosalie Reed Rodrigues Coelho pela revisão e pelas sugestões a este trabalho.

À minha mãe pela dedicação e carinho e pelo exemplo de força e de luta.

A Paulo, pela cumplicidade sem queixas, a Pedro, meu pedacinho de sol, pelo sorriso ao final de cada dia e à Tetê, meu pedacinho de lua, pela graça moleca.

À CAPES, pela bolsa de estudos ao longo do curso.

A todos os que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

A comunidade fitoplanctônica e a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas na Lagoa de Jacarepaguá (RJ) foram estudadas a partir de uma abordagem ambiental e experimental. A Lagoa de Jacarepaguá é oligohalina (0 a 10S), rasa e vem recebendo efluentes domésticos e industriais intensificados nas duas últimas décadas, tornando-se hipereutrófica ($136 \mu\text{g.L}^{-1}$ média anual de clorofila *a*). Realizou-se estudo de um ciclo anual (08/96 a 09/97) com amostragens quinzenais em três estações de coleta. Desde o início do estudo até o final da primavera (11/96) a comunidade fitoplanctônica foi dominada por clorofíceas, sobretudo Chlorococcales (61%), sendo substituídas por cianobactérias (87%), principalmente *Microcystis aeruginosa*, que tornou-se a espécie dominante pelo restante do período estudado. A biomassa de clorofíceas esteve associada positivamente com as concentrações de nitrato ($r=0,72$), fosfato ($r=0,55$) e com a profundidade da lagoa ($r=0,90$) e negativamente com salinidade ($r=-0,41$), temperatura ($r=-0,31$) e concentração de amônia ($r=-0,33$), já a biomassa de cianobactérias esteve diretamente relacionada a salinidade ($r=0,59$), concentração de amônia ($r=0,42$) e inversamente à transparência da água ($r=-0,40$) e temperatura ($r=-0,30$). Análises por HPLC demonstraram a presença de microcistinas (MC), heptapeptídeos cíclicos hepatotóxicos em todas as amostras do séston, após o surgimento de *M. aeruginosa* ($0,8$ a $979,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), mas não na água. A biomassa de *M. aeruginosa*, a concentração de MC no séston e a quota celular de microcistina (MC/célula de *M. aeruginosa*) foram mais elevadas na estação 3 (Arroio Pavuna), região que recebe a maior quantidade de efluentes com carga poluente. As variáveis ambientais que se relacionaram ao sucesso de *M. aeruginosa* na lagoa foram salinidade ($r=0,58$) e concentração de amônia ($r=0,41$). A salinidade demonstrou ser um fator importante para explicar o sucesso de cianobactérias nesse ambiente. Por outro lado, experimentos realizados em diferentes condições de salinidade (0, 2, 5 e 10S) para testar o crescimento e produção de microcistinas por *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-36) revelaram que a salinidade não trouxe benefício direto à cianobactéria. Resultados de cultivos realizados em presença e ausência de *Eichhornia crassipes*, macrófita abundante na lagoa, indicaram que há uma competição entre essas duas comunidades pelos recursos do meio e que o aumento de salinidade afetou principalmente a macrófita, eliminando-a e trazendo um benefício indireto para a comunidade de cianobactérias. Os valores intermediários de salinidade testados (2S e 5S) foram os de maior produção de microcistinas, apontando para o risco de ocorrência das florações de *M. aeruginosa* no ambiente estudado, onde esses são os valores de salinidade mais frequentes. As constantes flutuações de salinidade às quais a lagoa está sujeita oferecem um risco de proporcionar maior biomassa de cianobactérias e, em consequência, maior concentração de microcistinas, trazendo sérios problemas à saúde pública, em virtude do uso para a pesca e atividades de lazer desse ambiente.

INTRODUÇÃO

Lagoa de Jacarepaguá como exemplo de lagoa costeira hipereutrofica

A Lagoa de Jacarepaguá faz parte do sistema lagoas de Jacarepaguá (22° 35' S e 47° 34' W) que compreende as Lagoas de Jacarepaguá, Caramuru, da Tijoca, de Marapendi e Lagoinha, localizadas no município do Rio de Janeiro. Apresenta uma área de 3,7 km², profundidade média de 3,3m e é a mais contaminada das lagoas de estuário, com pontos de

ABSTRACT

The phytoplankton community and the occurrence of toxic cyanobacterial blooms in Jacarepaguá Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil, were studied in field and in laboratory. This is a shallow brackish coastal lagoon (0 to 10S) and has been receiving domestic and industrial waste for the two past decades, becoming hypereutrophic (136 $\mu\text{g.L}^{-1}$ annual average of chlorophyll *a*). A study of annual cycle was made (08/96 a 09/97) and the samples were collected each two weeks in three stations. From the begin of the study until the end of spring (11/96) the phytoplankton was dominated by green algae, specially Chlorococcales (61%) being replaced by cyanobacteria (87%), specially *Microcystis aeruginosa*, the dominant species until the end of the studies. The green algae biomass was positively related with nitrate ($r= 0,72$) and phosphorus concentration ($r= 0,55$), and with the deep meter ($r= 0,90$). The correlation was negative with salinity ($r= -0,41$), temperature ($r= -0,31$) and ammonium concentration ($r= -0,33$). The cyanobacteria biomass was directly related to salinity ($r= 0,59$) and ammonium concentration ($r= 0,42$) and indirectly to water transparency ($r= -0,40$) and temperature ($r= -0,30$). The HPLC analysis showed the presence of microcystins (MC), hepatotoxic cyclic heptapeptides, in all the seston samples (0,8 to 979,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$), after the beginning of *M. aeruginosa*, but not dissolved in the water. The *M. aeruginosa* biomass, seston MC concentration and cell quota of microcystins (MC/cell of *M. aeruginosa*) were higher in station 3 (Arroio Pavuna), where the waste input is greater. The success of *M. aeruginosa* in the lagoon was related to salinity ($r= 0,58$) and ammonium concentration ($r= 0,41$). The variation of salinity was important to explain the development of cyanobacterias in this water system. The experiments in different salinity conditions (0S, 2S, 5S and 10S) with *M. aeruginosa* (NPLJ-37) growth and microcystins production revealed that salinity has not favored the cyanobacteria. The *M. aeruginosa* culture with and without *Eichhornia crassipes*, abundant macrophyte in the lagoon, showed a competition between this both communities about the nutritional resources, and the macrophyte community (*Eichhornia crassipes*) was eliminated during high salinity, contributing indirectly to cyanobacteria community development. The salinity intermediate values tested (2S and 5S) corresponded to the higher microcystins production, showing the risk of *M. aeruginosa* blooms to this environment, since these intermediate values are the most frequent. The constant salinity variations in this lagoon could contribute to increase the hepatotoxic *M. aeruginosa* biomass, and to increase the microcystins concentration, with consequences for fishing and pleasure activities in this environment.

INTRODUÇÃO

I. Lagoa de Jacarepaguá como exemplo de lagoa costeira impactada

A Lagoa de Jacarepaguá faz parte do Sistema Lagunar de Jacarepaguá (22° 55' S e 42° 24' W), que compreende as Lagoas de Jacarepaguá, Camorim, da Tijuca, de Marapendi e Lagoinha, localizadas no município do Rio de Janeiro. Apresenta uma área de 3,7 km², profundidade média de 3,3m e é a mais continental das lagunas do sistema, que possui ao todo 130 km². A comunicação com o mar é indireta e se faz pelo canal artificial da Joatinga, resultando numa salinidade variando entre 0 e 10S. A bacia de drenagem, de 102,8 km², tem como principais afluentes com descarga poluente o Arroio Pavuna, o Canal do Rio Centro (receptor de resíduos das caixas de gordura do Rio Centro) e o Arroio Fundo, que embora deságüe na Lagoa do Camorim, penetra no interior da Lagoa de Jacarepaguá nos períodos de subida de maré (Fernandes, 1993).

O clima é do tipo "Am" (tropical chuvoso megatérmico), segundo a classificação de Köppen, que se caracteriza por um verão úmido e um inverno seco (Zee, 1994).

Sistemas lagunares representam, em termos mundiais, 13% dos ambientes costeiros e caracterizam-se por acumular matéria orgânica, apresentando alta produtividade e biomassa, tanto autotrófica como heterotrófica (Barnes, 1980). São ambientes de pouca profundidade, o que associado aos ventos freqüentes comuns nas áreas costeiras, quase sempre garantem uma homogeneidade da coluna d'água. Além disso, são freqüentemente impactados por ação antropogênica e em termos mundiais encontram-se, na maioria dos casos, em processo de eutrofização, sendo mesmo considerados ecossistemas sob estresse (Kjerfve, 1994).

De acordo com o sistema de Kjerfve (1986) baseado na hidrologia, e morfologia do corpo d'água, a Lagoa de Jacarepaguá se classificaria como uma lagoa sufocada, por apresentar longo tempo de residência da água e em conseqüência pouca troca de água com o mar. Tais características acentuam o processo de eutrofização deste ambiente.

O impacto de origem antropogênica pode ser verificado em toda a região da Baixada de Jacarepaguá, particularmente no que diz respeito à desordenada ocupação urbana, processo que ainda se encontra em franco desenvolvimento. Imensos e luxuosos condomínios dividem espaço com pequenas favelas ao redor das lagoas, sem considerar as construções de hipermercados, centros comerciais e similares cada vez mais freqüentes. A imensa maioria dessas edificações não possui qualquer tratamento primário para seus

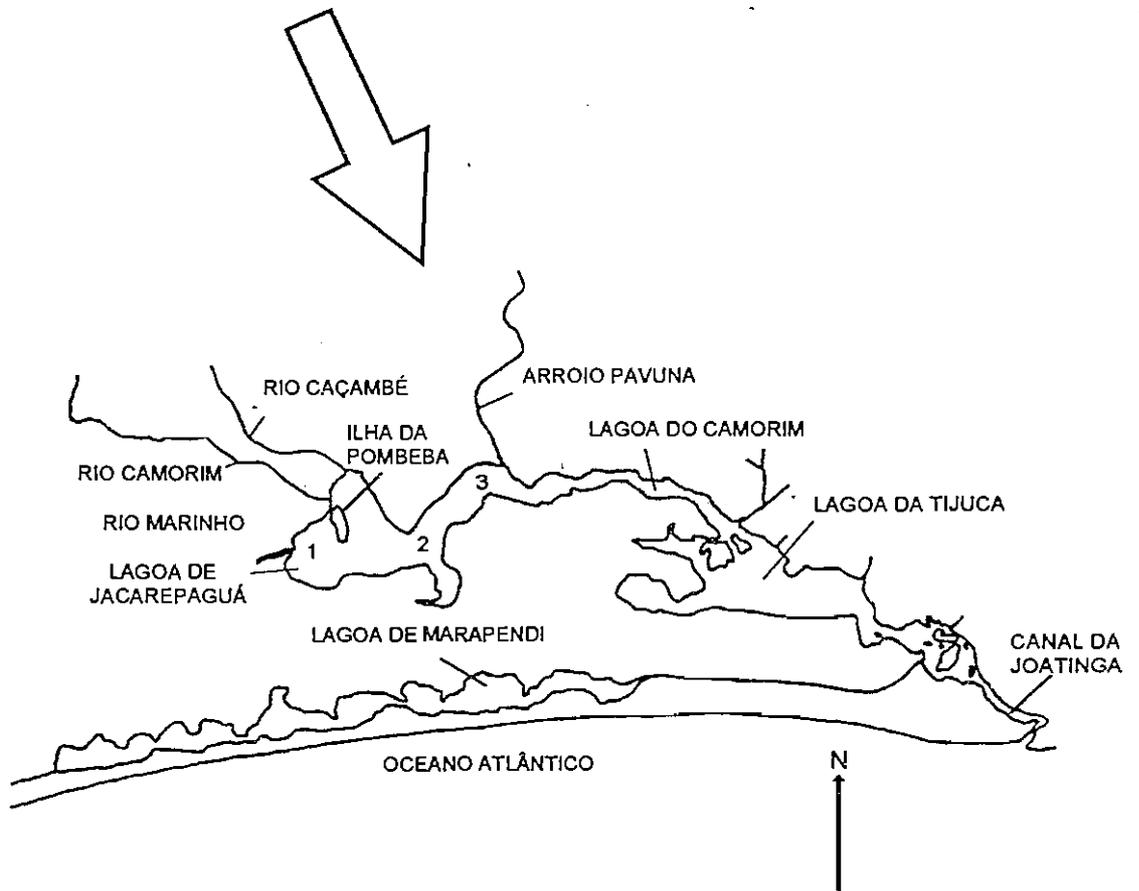
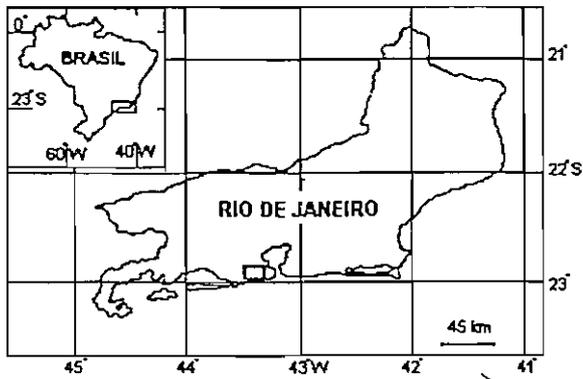


Figura 1 – Localização da Lagoa de Jacarepaguá e das estações de coleta.
 Estação 1 – Rio Marinho; Estação 2 – Aeronáutica e Estação 3 – Arroio Pavuna.

efluentes, que deságuam “in natura” nas lagoas. No caso da Lagoa de Jacarepaguá há que se acrescentar o desenvolvimento de uma industrialização urbana no bairro de mesmo nome e arredores, cujos resíduos vão desaguar também na lagoa (Feema, 1982; Feema, 1984). É importante frisar que todas as lagoas deste complexo lagunar se intercomunicam, distribuindo de forma mais ou menos homogênea as descargas que recebem.

A eutrofização artificial observada na Lagoa de Jacarepaguá já era apontada há 15 anos como de séria gravidade (Saieg-Filho, 1986) e atualmente pode ser enquadrada na categoria de hipereutrificada, segundo os critérios da OECD (1982). O acúmulo de nutrientes neste corpo d'água tem contribuído para a ocorrência de freqüentes florações de cianobactérias. Processo similar vem sendo observado em outras lagoas costeiras fluminenses. (Huszar, 1989; Knoppers & Moreira, 1990; Domingos 1991; Domingos *et al.*, 1994; Melo e Suzuki, 1998).

Uma das características do processo de eutrofização é o aumento relativo de cianobactérias. O primeiro registro em literatura de florações de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá data de 1970, num estudo de Semeraro e Costa (1972) que não citaram os organismos formadores dessas florações. Esses autores destacavam a freqüente ocorrência de coloração castanha nas águas da lagoa então, causada por florações de *Gymnodinium* spp.

Atualmente as florações de cianobactérias são causadas principalmente por *Microcystis aeruginosa* e vêm causando intensa coloração verde às águas da lagoa, sendo as colônias visíveis a olho nu na subsuperfície. O fenômeno é recorrente e conhecido pela população local de pescadores, que referem-se às florações como “sementes de gigoga”, acreditando que sejam sementes de *Eichhornia crassipes*.

A presença de *Eichhornia crassipes* (aguapé, jacinto da água, gigoga) é comum na Lagoa de Jacarepaguá, podendo alcançar grande desenvolvimento e terminando por formar um tapete sobre a superfície da água, encobrindo quase completamente o espelho d'água da lagoa. O desenvolvimento de alta biomassa dessa macrófita aquática está freqüentemente associado à elevada concentração de nutrientes dissolvidos no meio, onde podem desempenhar importante papel, por absorverem grandes quantidades desses nutrientes (Petrucio, 1997).

Cabe ainda considerar a importância sócio-econômica e ambiental das lagoas costeiras como áreas para a reprodução de diversas espécies de peixes e demais animais de interesse econômico como crustáceos e moluscos. A Lagoa de Jacarepaguá caracteriza-se

por ser uma área de intensa atividade extrativa através da pesca de várias espécies que ali se reproduzem, realizada principalmente por integrantes de uma colônia de pescadores situada às suas margens. Entretanto, a oferta e qualidade do pescado vem caindo nesse ambiente, obrigando os pescadores a deslocarem-se para pescar em outros locais. O processo de degradação ambiental verificado provavelmente contribuiu para o desaparecimento de espécies mais sensíveis, sobretudo as de final da cadeia trófica, que são as de maior interesse econômico.

II. Comunidade Fitoplanctônica de Lagoas Costeiras

Lagoas costeiras, por serem ambientes rasos, frequentemente impactados, constituem-se corpos d'água particulares, cujas comunidades fitoplanctônicas apresentam algumas características comuns tais como: abundância de formas flageladas (Barnes, 1980), abundância/dominância de organismos nanoplanctônicos (Barnes, 1980) e, dependendo da intensidade de troca de água com o oceano, apresentam maior ou menor contribuição de espécies marinhas. São muitos os registros de dominância de cianobactérias em lagoas costeiras no Brasil (Callegaro *et al.*, 1981; Konrath *et al.*, 1997 e Yunes, 2000) e, particularmente no Estado do Rio de Janeiro, nas lagoas de Saquarema (Domingos, 1991), Guarapina (Knoppers & Moreira, 1990), Barra (Domingos *et al.*, 1994), Juturnaíba (Huszar, 1989) e Imboassica (Melo e Suzuki, 1998). A dominância de cianobactérias nestes ambientes pode facilmente alcançar contribuição percentual acima de 80% do total da biomassa da comunidade fitoplanctônica (Huszar e Silva, 1999).

Saieg-Filho (1986) realizou um estudo sobre o fitoplâncton marginal da Lagoa de Jacarepaguá de 08/84 a 08/85, sendo que a única cianobactéria registrada no estudo foi *Oscillatoria* sp.

As florações de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa de Jacarepaguá vêm sendo registradas desde 1990 (Fernandes, 1993). Além disso, já foram identificadas e isoladas de amostras fitoplanctônicas dessa lagoa duas cepas que se mostraram hepatotóxicas (Molica, 1996).

A dominância de cianobactérias tóxicas em ambientes eutrofizados é um problema crescente em termos mundiais (Falconer, 1999; Codd, 2000). Florações, em zonas litorâneas afetam a reprodução de peixes e pássaros, que se dão nessas áreas e podem influenciar processos ecológicos importantes como a produção primária. As florações de

cianobactérias por si só deterioram a qualidade da água, podendo causar maciças mortandades de peixes. Neste caso, a intoxicação pode se dar tanto por via oral como pelas brânquias, podendo os peixes carnívoros contaminarem-se através das presas que ingerem. Quanto aos pássaros, provavelmente sensíveis, a confirmação de intoxicação sem exames histopatológicos torna-se muito difícil, em virtude desses animais percorrerem amplas distâncias, visitando diferentes ambientes (Lindholm *et al.*, 1992).

Segundo Lindholm *et al.* (1992) também a atividade microbiana é reduzida durante florações de cianobactérias, em função da atividade antibiótica de muitas espécies o que, em última instância, contribui para acumulação de matéria orgânica no sedimento, uma vez que a velocidade da reciclagem realizada pelos microrganismos torna-se reduzida. Entretanto, nas lagoas costeiras tropicais, devido às altas temperaturas, tudo parece indicar que a atividade de decomposição da matéria orgânica permanece muito eficiente na própria coluna d'água, garantindo até 70% dos recursos necessários para sustentar a produção primária (Couto, 1989; Carmouze, com. pess.).

III. Causas da Dominância de Cianobactérias

Dentre as principais causas apontadas na literatura como relacionadas ao sucesso de cianobactérias no meio aquático, destacam-se a baixa razão TN/TP (Smith, 1983), baixa concentração de CO₂ ou alto pH (Shapiro, 1990, 1997), pequena pressão de herbivoria (Haney, 1987; Sommer *et al.*, 1986), alta temperatura (Robarts e Zohary, 1987), possibilidade de regular sua flutuação em ambientes com alta (Ganf, 1974) e baixa turbulência (Reynolds, 1987), baixa intensidade luminosa (Zevenbon e Mur, 1980; Smith, 1986); possibilidade de armazenar fósforo (Pettersson *et al.*, 1993), fabricação e secreção de substâncias alelopáticas (Fay, 1983; Keating, 1978).

O aumento do grau de trofia freqüentemente amplia a dominância desse grupo (Jensen *et al.*, 1994), de tal forma que a disponibilidade de nutrientes tem sido considerada um fator importante, destacando-se tanto a concentração de fósforo solúvel reativo no meio (Watson *et al.*, 1997), quanto a do fósforo total (Duarte e Augustí, 1992), considerado por alguns autores melhor indicador da biomassa total e relativa de cianobactérias (Trimbee e Prepas, 1987). A habilidade para fixar nitrogênio molecular, em meios deficientes tanto de nitrato quanto de amônia foi considerada favorável para a dominância de formas fixadoras,

enquanto a ausência de nitrato e baixa concentração de amônia são condições favoráveis para o desenvolvimento de espécies não fixadoras (Blomqvist *et al.*, 1994).

A razão TN/TP superior a 32 (por peso) foi considerada restritiva para a dominância de cianobactérias por alguns autores (Smith, 1983; Jensen *et al.*, 1994), mas entendida por outros como consequência, e não causa da dominância desses organismos, uma vez que a limitação para a incorporação dos recursos nutrientes é determinada por suas concentrações no meio e não pelas proporções em que ocorra (Reynolds, 1997; Reynolds, 1999).

Algumas condições ambientais favoráveis para a dominância de cianobactérias (baixa razão Z_{eu}/Z_{max}) são apontadas como desfavoráveis para Chlorophyceae, mais precisamente para Chlorococcales (Jensen *et al.*, 1994). Diferentes estratégias são observadas nestes dois grupos, sendo que maiores taxas de crescimento e perda são características de Chlorophyceae, ocorrendo o inverso com cianobactérias.

As Chlorococcales podem dominar tanto em águas ricas como empobrecidas em nutrientes inorgânicos, sofrem alta pressão de herbivoria em ambientes produtivos e necessitam turbulência no epilímnio para suspensão, a fim de obterem alta incidência luminosa (Haphey-Wood, 1988).

Cianobactérias são muitas vezes consideradas ubíquas, com amplo espectro de tolerância ambiental, mas representam na realidade um grupo heterogêneo, com grande diversidade de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Reynolds, 1987).

As diferentes estratégias observadas entre espécies do grupo, quanto a mecanismos de flutuação, mecanismos de resistência, composição e conteúdo de pigmentos dentre outros, demonstram na realidade que cianobactérias incluem vários subgrupos ecológicos com requisitos externos bem definidos, e que portanto são assim como os demais organismos vivos, sensíveis à mudanças do ambiente (Pearl, 1988). A existência de diferentes eco e morfotipos que compõem esse grupo, podem talvez, explicar alguns resultados controversos quanto às variáveis ambientais consideradas favoráveis para esses organismos.

Além disso, o ambiente natural é o resultado da interação de diversas variáveis que, consideradas isoladamente, não conseguem traduzir a dinâmica que se observa no meio aquático.

Organismos vivos há muito têm sido considerados bons descritores e indicadores das condições do meio (Palmer, 1969). O uso de comunidades como descritores oferece um sensor ainda mais refinado, traduzindo inclusive a sinergia entre componentes do ambiente

que ocorre em concentrações traço ou não monitorados (Schelske, 1984). As associações das espécies dominantes em determinadas áreas do sistema ou em épocas diferentes são a expressão de todo o sistema, pois respondem ao conjunto dos fatores que o definem (físicos, químicos e biológicos), além de revelarem as estratégias mais eficientes para o sucesso no plâncton.

Dessa forma, a dominância dos organismos num determinado meio traduz a síntese dessas forças condicionantes, sendo os organismos dominantes considerados melhores descritores do meio (Reynolds, 1997). As associações de espécies representam a expressão das estratégias selecionadas em resposta aos fatores dominantes para o desenvolvimento de biomassa e representam um instrumento poderoso, sensível e integrador para a caracterização do ambiente.

IV. Produção de Cianotoxinas em Ambientes Naturais

Muitas das espécies de cianobactérias envolvidas em fenômenos de floração produzem potentes toxinas (cianotoxinas) com efeitos neurotóxicos (neurotoxinas), hepatotóxicos (hepatotoxinas), dermatotóxicos ou citotóxicos (Chorus e Bartram, 1999).

Quanto à estrutura química, já foram caracterizados três grupos principais de cianotoxinas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. Os peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas) são reconhecidamente hepatotóxicos; os alcalóides denominados anatoxina-a, anatoxina-a (s) e o grupo das saxitoxinas são neurotóxicos, enquanto que a cilindrospermopsina tem efeito citotóxico e hepatotóxico. Os lipopolissacarídeos (LPS) são irritantes potenciais de qualquer tecido exposto, semelhantes aos LPS encontrados em bactérias Gram negativas.

Essas toxinas são metabólitos secundários, ou seja, compostos que não são utilizados pelo metabolismo primário da célula. As neurotoxinas já foram identificadas nos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* e hepatotoxinas nos gêneros: *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Cylindrospermopsis* e *Hapalosiphon* (Chorus e Bartram, 1999).

As hepatotoxinas até agora caracterizadas são heptapeptídeos cíclicos conhecidos como microcistinas, o pentapeptídeo designado como nodularina, produzido pelo gênero *Nodularia* e a cilindrospermopsina, produzida por *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Umezakia* (Chorus e Bartram, 1999).

As intoxicações por microcistinas são as causas mais comuns de toxicoses por cianobactérias em animais, nos casos de contaminação de água (Carmichael, 1996).

Além de *Microcystis* também produzem microcistinas espécies dos gêneros: *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*) e *Hapalosiphon* (Carmichael, 1996). A estrutura cíclica geral da molécula contém 5 D-aminoácidos e 2 L-aminoácidos, que diferem e caracterizam os diferentes tipos de microcistinas. Dentre os D-aminoácidos, há um tipo incomum, chamado Adda que é o componente estrutural responsável pela atividade biológica da molécula (Fig. 2).

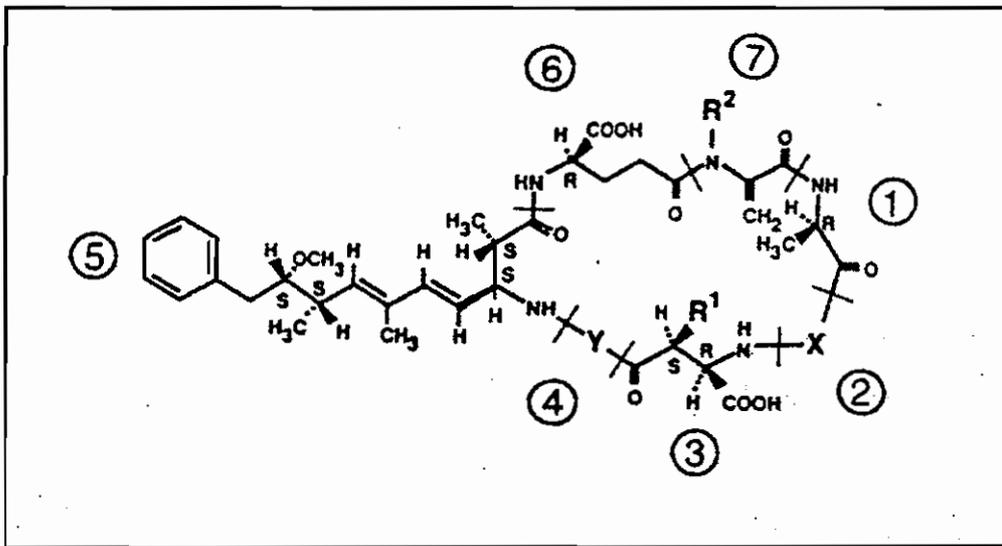


Figura 2 - Estrutura da molécula de microcistina, segundo Carmichael (1992).

(1-7) representam os aminoácidos constituintes da molécula; (5) indica o aminoácido ADDA; (2 e 4) são os L-aminoácidos, representados por X e Y.

Atualmente já se tem conhecimento de cerca de 60 variações estruturais de microcistinas. A variação na estrutura da molécula é mais frequentemente reportada como substituição dos L-aminoácido nas posições 2 e 4 e metilação dos aminoácidos nas posições 3 e/ou 7 (Chorus e Bartram, 1999).

A toxicidade destas microcistinas é praticamente a mesma e todas apresentam sintomas similares de envenenamento. A DL₅₀ (i.p.) (dose letal de toxina necessária para

matar 50% do animal usado no teste experimental, normalizado para quilograma de peso do corpo) está entre 60 e 70 µg/Kg de peso corpóreo (Carmichael, 1994).

Microcistinas são endotoxinas (toxinas intracelulares) e que portanto somente são liberadas para água por lise celular (Carmichael, 1994). Esta toxina foi primeiramente isolada de *Microcystis aeruginosa*, que é o gênero mais freqüente em formação de florações e em casos de envenenamento humano ou de animais (Carmichael, 1996). Atuam como inibidores seletivos de proteína serina/treonina fostatase (PP-1 e PP-2A) (Fujiki *et al.*, 1996) e como agravante, essas toxinas são também reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Fujiki *et al.*, 1996).

A via biossintética das microcistinas tem sido investigada e os estudos vêm concluindo que microcistinas são sintetizadas por via pós transcricional, devendo seguir vias enzimáticas secundárias de síntese peptídica (Chorus e Bartram, 1999). Dittmann *et al.* (1997) identificaram os genes de peptídeos sintetase responsáveis pela síntese de microcistinas, demonstrando que a via biossintética é não-ribossomal. Esses autores demonstraram ainda que cepas não tóxicas de *M. aeruginosa* não possuem os genes que codificam a microcistina sintetase.

A maioria das microcistinas é solúvel em água, exceto algumas poucas microcistinas hidrofóbicas e, portanto, são incapazes de atravessar diretamente a membrana lipídica de animais, plantas e bactérias (Chorus e Bartram, 1999).

Devido a alta estabilidade química e solubilidade na água verificada por esse grupo de hepatotoxinas, sua presença assume importantes implicações para o ambiente em função da persistência dessas moléculas na superfície dos corpos d'água, aumentando o risco de exposição a essas toxinas. A persistência no meio aquático pode ser de 15 dias (dissolvida na água) a 30 dias (nas células) (Chorus e Bartram, 1999).

As microcistinas são extremamente estáveis e resistentes à hidrólise química ou à oxidação próxima a pH neutro. Microcistinas e nodularina permanecem potentes mesmo após fervura. Uma rápida hidrólise química pode ocorrer somente em condições improváveis de acontecer fora de laboratórios, como por exemplo em meio com 6M HCl em alta temperatura (Chorus e Bartram, 1999).

Apesar de quimicamente estável e resistente a peptidases de organismos eucarióticos e de várias bactérias, as microcistinas são suscetíveis a quebra por bactérias aquáticas em rios e reservatórios. São bactérias aparentemente comuns e amplamente

distribuídas (efluente de despejos, água de lagos e rios e sedimentos de corpos d'água) (Chorus e Bartram, 1999).

A produção de microcistinas por *Microcystis aeruginosa* em ambientes naturais tem merecido registro por vários autores. (Wicks e Thiel, 1990; Carmichael, 1992; Lindholm *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992; Kotak *et al.*, 1995; Kotak *et al.*, 2000).

No Brasil, vários corpos d'água também têm apresentado a ocorrência de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* (Costa & Azevedo, 1994 – no Estado de São Paulo; Molica, 1996 – no Estado do Rio de Janeiro e Yunes, 2000 – no Estado do Rio Grande do Sul) principalmente em reservatórios de abastecimento público, embora possamos estimar que existam vários casos sem registros em outras regiões do país.

Já foi demonstrado que microcistinas podem ser acumuladas através da cadeia trófica (zooplâncton, invertebrados, moluscos, peixes) e representam perigo potencial por biomagnificação (Chorus e Bartram, 1999).

Na Lagoa de Jacarepaguá, já foi registrada a bioacumulação de microcistinas no zooplâncton (Ferrão-Filho, 1998) e em peixes *Tilapia rendalis* (vísceras, fígado e músculos) (Magalhães *et al.*, 2001).

Em muitos países danos a rebanhos e pássaros, animais domésticos, animais de vida selvagem e peixes causadas por intoxicação por microcistinas têm sido demonstrados (Carmichael, 1996).

As principais vias de exposição para o homem das cianotoxinas são nas águas de uso recreacional de lagos e rios (vias dérmica ou oral – irritação de pele e olhos) e através do consumo de água potável (via oral). Dentre as atividades recreacionais de risco em ambientes contaminados por microcistinas, é considerado de alta exposição o nado e mergulho (Carmichael, 1996).

Há registros de conseqüências brandas a graves à exposição recreacional por microcistinas, que variam dependendo da concentração e via de exposição. Destacam-se leves irritações de pele, lábios e olhos, pneumonia aguda através de inalação de *Microcystis* tóxica, hepatoenterites, gastroenterites, vômito, diarreia, dor abdominal (Falconer, 1999). No Brasil foi feito o primeiro registro comprovado de intoxicação por microcistinas que levou pacientes renais à morte por via endovenosa (Jochimsen *et al.*, 1998).

A ocorrência de florações tóxicas de *Microcystis* é normalmente citada para ambientes continentais, sendo poucos os registros em ambientes costeiros como estuários e

lagoas costeiras (Paerl *et al.*, 1984; Yunes *et al.*, 1998), mas sempre reportando à espécie *Microcystis aeruginosa*.

Há indícios, entretanto, de ocorrência de microcistinas em ambientes marinhos. Evidências de necrose e megalocitose do fígado têm sido encontradas em animais marinhos. Compostos isolados desses fígados tiveram padrão cromatográfico idêntico ao de microcistinas e também inibiram a proteína fosfatase (Sellner, 1997). Porém, a fonte da síntese de moléculas de microcistinas no meio marinho ainda não foi identificada. Pimentel (1997) comprovou a produção de microcistinas por cepa de *Synechocystis aquatilis* f. *salina* isolada do meio marinho (Baía de Sepetiba – RJ). Além disso foi registrada recentemente a produção de microcistinas por cianobactérias picoplanctônicas (Domingos *et al.*, 1999) as quais são freqüentes e abundantes no meio marinho (Stockner e Antia, 1986).

Mesmo os estudos que registraram *M. aeruginosa* em ambientes oligoalinos ou mesoalinos ressaltaram a diminuição de biomassa dessa espécie e/ou eliminação em resposta ao aumento da salinidade acima de 5‰ (Paerl *et al.*, 1984 ; Yunes *et al.*, 1998).

A principal razão para a ausência de organismos de água doce como *Microcystis* nos ambientes costeiros reside em sua pequena tolerância à pressão osmótica. Organismos introduzidos do meio continental podem ser incapazes de ajustar-se ao aumento do estresse osmótico por produção de fatores compensatórios, como aumento da concentração intracelular de osmólitos, exibindo assim inibição de atividade. Populações adaptadas à flutuações de salinidade são capazes de ajustar-se a essa variação pela produção de osmólitos compatíveis (Paerl, 1996). Essa característica termina por selecionar espécies halotolerantes.

A sobrevivência às condições desfavoráveis de alta salinidade exigem dos organismos que vivem nesse ambiente estratégias fisiológicas adaptativas, como produção de enzimas resistentes ao sal e acumulação de solutos orgânicos de baixo peso molecular que substituem a função osmótica de íons inorgânicos (Na^+) e são menos tóxicos (Hellebust, 1976; Reed e Stewart, 1988). Também são observadas mudanças de ultraestrutura, especialmente a redução da permeabilidade da membrana plasmática que é alcançada pelo aumento no conteúdo lipídico ou alteração na composição lipídica (Erdmann *et al.*, 1992). Existem evidências crescentes de alterações na expressão gênica, com modificação no padrão de síntese protéica e surgimento de proteína do estresse

(Erdmann *et al.*, 1992; Abe citado em Tandeau de Marsac, 1986) como respostas ao aumento de salinidade.

Íons Na⁺ também têm sido sugeridos como osmoreguladores intracelulares, através de extrusão ativa em meios com salinidade. É o processo mais freqüente em células sujeitas a choque hiperosmótico (Reed e Stewart, 1988).

Em geral, o tipo de soluto acumulado pelas células depende de sua tolerância à salinidade, destacando-se três grupos de respostas: (a) o das cepas pouco tolerantes que acumulam dissacarídeos (sucrose e trealose); (b) o das cepas medianamente halotolerantes que produzem heterosídeos (glucosil e glicerol); e (c) o das cepas altamente halotolerantes que acumulam compostos quaternários de amônia. Entretanto, pode haver síntese de um osmótico orgânico secundário sob certas condições ambientais (Reed e Stewart, 1988).

Em condições de diminuição de salinidade as células rapidamente eliminam os solutos para o meio externo, antes que o influxo de água rompa a membrana celular (Darley, 1982).

De acordo com Reed e Stewart (1988), a liberação de osmólitos orgânicos pode estar envolvida no desenvolvimento de comunidades heterotróficas associadas a cianobactérias em gradientes de flutuação de salinidade.

O crescimento de cianobactérias e a concentração de cianotoxinas em diferentes condições de salinidade têm sido testados em laboratório, demonstrando a influência dessa variável na resposta dos dois fatores estudados. *M. aeruginosa* demonstrou maior produção de microcistinas em salinidades intermediárias (1,0 e 1,5S) do que em teores extremos (0,5 e 2,5S) (Yunes *et al.*, 1998), enquanto *Nodularia spumigena* demonstrou uma relação inversa entre salinidade e produção de nodularina e maior crescimento nos valores intermediários de salinidade testados (12 e 24 S) (Blackburn *et al.*, 1996).

A evidência da existência de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* halotolerantes representa uma nova dimensão para o problema da ocorrência de florações tóxicas em ambientes naturais, que necessita ser melhor investigada.

V. Influência de Fatores Ambientais na Produção de Microcistinas

A influência de fatores ambientais como temperatura (Runnegar *et al.*, 1983; van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe e Oishi, 1985; van der Westhuizen *et al.*, 1986 e

Codd e Poon, 1988), intensidade luminosa (van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe e Oishi, 1985; Codd e Poon, 1988 e Utkilen e Gjølme, 1992), concentração de nutrientes no meio externo (Codd e Poon, 1988; Utkilen e Gjølme, 1992 e Orr e Jones, 1998), pH (van der Westhuizen e Eloff, 1983) e de micronutrientes (Lukac e Aegerter, 1993) sobre a toxicidade de *Microcystis* tem sido observada em experimentos de laboratório.

A temperatura entre 18 e 25° C foi considerada ótima para a produção de microcistinas por *M. aeruginosa* (Gorham, *et al.*, 1964; Runnegar *et al.*, 1983; van der Westhuizen e Eloff, 1985; Codd e Poon, 1988), enquanto que o fósforo em baixa concentração pode aumentar em até 2,3 vezes a produção de microcistinas/unidade daquela mesma espécie (Utkilen e Gjølme, 1992). Entretanto outros autores concluíram que esse nutriente não exerce qualquer efeito, ou muito pouco efeito sobre a toxicidade de *M. aeruginosa* (Watanabe e Oishi, 1985; Codd e Poon, 1988).

A intensidade luminosa foi considerada sem influência na faixa de 1250 a 17220 lux e de 5 a 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para a toxicidade de *M. aeruginosa* por Gorham *et al.* (1964), Codd e Poon (1988), respectivamente, contrastando com Watanabe e Oishi (1985) e Utkilen e Gjølme (1992) que registraram inibição da produção de microcistinas abaixo de 7,5 e acima 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente, podendo modificar em até 3 vezes o conteúdo de MC/unidade de biomassa em *M. aeruginosa* (Utkilen e Gjølme, 1992; Watanabe e Oishi, 1985).

A concentração de nitrogênio revelou pouca influência sobre a produção de microcistinas no estudo de Watanabe e Oishi (1985), entretanto sua diminuição ou remoção do meio de crescimento causou decréscimo na toxicidade segundo Codd e Poon (1988) e Utkilen e Gjølme (1992).

O pH estimulou a produção de microcistinas em valores acima e abaixo do ótimo para o crescimento de *M. aeruginosa* (van der Westhuizen e Eloff, 1983).

Estes estudos, entretanto, têm sido criticados por alguns autores por terem utilizado o peso seco como unidade de biomassa de *M. aeruginosa*, contribuindo para as discordâncias nos resultados obtidos, juntamente com o uso de técnicas diferenciadas (bioensaio ou HPLC) para estimar a concentração de microcistinas (Utkilen e Gjølme, 1992; Orr e Jones, 1998).

Apesar de cianobactérias tóxicas ocorrerem em grande número de lagos, reservatórios e rios no mundo todo, são raras as informações quantitativas sobre a variação

sazonal da composição de espécies de cianobactérias associadas à variação sazonal da concentração de microcistinas no fitoplâncton, dissolvidas na água ou por unidade de cianobactéria. Estes estudos (Wicks e Thiel, 1990; Kotak *et al.*, 1995; Kotak *et al.*, 2000) têm revelado resultados controversos quanto ao efeito dos fatores ambientais sobre a toxicidade da floração.

OBJETIVOS

Em face do conhecimento da ocorrência freqüente de florações de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá, com conseqüências potenciais para a comunidade aquática e até para a saúde pública, este trabalho teve como objetivos:

- (1) Compreender os fatores ambientais que regulam a ocorrência das populações fitoplancônicas dominantes na Lagoa de Jacarepaguá durante o período estudado, que está apresentado no capítulo I;
- (2) Analisar as variáveis ambientais relacionadas ao sucesso de *M. aeruginosa* e à produção de microcistina neste ambiente, desenvolvido no capítulo II;
- (3) Testar a influência da salinidade sobre o crescimento e toxicidade de uma cepa de *M. aeruginosa* e sobre o crescimento de *Eichhornia crassipes* (macrófita aquática) e testar a influência de *E. crassipes* sobre o crescimento e toxicidade dessa cepa, em diferentes condições de salinidade, que compreende o capítulo III.

O conhecimento desses aspectos da ecofisiologia e toxicologia das cianobactérias predominantes na Lagoa de Jacarepaguá certamente permitirá um avanço em técnicas de manejo e remediação do problema bem como subsidiará estudos biotecnológicos de cepas isoladas.

METODOLOGIA

1. Identificação e Quantificação do Fitoplâncton

As amostras foram coletadas a cada 15 dias em três estações de coleta (Estação Rio Marinho - 1; Estação Aeronáutica - 2 e Estação Arroio Pavuna - 3), pela manhã, de agosto de 1996 a setembro de 1997 na Lagoa de Jacarepaguá. As amostras de fitoplâncton foram fixadas com solução de Lugol e a identificação foi feita com organismos vivos e fixados, usando microscópio Zeiss Standard 18 e microscópio ótico Olympus.

A quantificação seguiu o proposto por Utermöhl (1958) e foi feita em microscópio invertido Zeiss Axiovert 10. As células foram quantificadas em campos aleatórios como proposto por Uhelinger (1964). Pelo menos cem espécimes da espécie dominante foram enumeradas (Lund *et al.*, 1958). O biovolume das espécies foi calculado como proposto por Edler (1979) e o conteúdo de carbono fitoplanctônico foi estimado de acordo com as recomendações de Edler (1979). A estimativa de biomassa de *M. aeruginosa* seguiu um procedimento diferente, pois para o cálculo do biovolume dessa espécie foram realizadas medidas de comprimento (C), largura (L) e espessura (E) das colônias em diferentes faixas de tamanho. Após a realização das medidas, foi estabelecida a razão entre C/E e L/E, permitindo, a partir das medidas de comprimento e largura, estimar a espessura para cada faixa de tamanho. Esse procedimento foi adotado em função da extrema dificuldade em obter as medidas de espessura, em virtude da forma bastante achatada das colônias, principalmente nas colônias mais velhas.

Para a identificação taxonômica foram utilizadas principalmente as obras de Komarék e Anagnostidis (1989) e Komarék e Anagnostidis (1999) para as Cyanobacteria (daqui em diante referidas como cianobactérias), Komarék e Fott (1983) para as Chlorophyceae, Chlorococcales (daqui em diante referidas como clorococcales); Trondsen (1993) para as Prasinophyceae (daqui em diante referidas como prasinofíceas, ou incluídas em flagelados); Huber-Pestalozzi (1950) para as Cryptophyceae (aqui chamadas criptofíceas ou incluídas dentre os flagelados) e Round *et al.* (1996) para as Bacillariophyta (daqui em diante referidas como diatomáceas).

2. Variáveis Abióticas

Os métodos utilizados para a determinação dos nutrientes inorgânicos dissolvidos estão descritos em Carmouze (1994). Foram determinados o Fósforo Solúvel Reativo (fosfato, PO_4^{-3}), Nitrato (NO_3^-) e Amônia (NH_4^+) e para o cálculo do

Nitrogênio Inorgânico Dissolvido (NID) consideraram-se ainda as concentrações de Nitrito. A temperatura da água foi medida com um termômetro acoplado a um potenciômetro portátil, usado para determinar os valores de pH (Mettler Toledo - MP120). Os valores de salinidade foram obtidos usando-se um refratômetro. A concentração do oxigênio dissolvido foi estimada com um eletrodo de oxigênio (Mettler Toledo - MO 128). A transparência da água foi estimada através do disco de Secchi, e a razão profundidade da zona eufótica/profundidade máxima ($Z_{eu}/Z_{máx.}$) foi estabelecida a partir do cálculo da profundidade da zona eufótica, utilizando a seguinte fórmula:

$$d.S. \times 1,7 = Z_{eu}$$

onde:

d.S. = medida do disco de Secchi (Reynolds, 1984)

3. Extração e Quantificação de Microcistinas (MC)

3.1 - No séston.

Quinzenalmente, dois litros das amostras de água de cada ponto de coleta foram filtradas em filtro de borosilicato. As microcistinas retidas no filtro foram extraídas 3 vezes sucessivamente, usando-se como solvente uma solução de butanol:metanol:água, (1:4:15 v/v). Após centrifugação do extrato, o sobrenadante foi evaporado e seco até 30% do volume inicial. Esse extrato foi passado através de um cartucho de C-18 (Bond Elut C-18, Varian). Os cartuchos foram eluídos com 20 mL de água deionizada, metanol 20% e metanol 100%, sucessivamente. Após total evaporação da fração metanólica 100% e ressuspensão do eluado em metanol 50%, as amostras foram filtradas em filtro de nylon e submetidas a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para identificação da presença de microcistinas (Krishnamurthy *et al.*, 1986).

A determinação de toxina no séston foi também utilizada para o cálculo da quota celular de microcistina, que é a quantidade de microcistina por célula de *M. aeruginosa*.

3.2 - Na água

A determinação da concentração de microcistinas (MC) na água foi realizada a cada 15 dias. Cada amostra foi inicialmente filtrada (2 L), e o filtrado foi diretamente passado em cartucho de ODS (Bond Elut C-18, Varian). Os cartuchos foram eluídos com água deionizada, metanol 20% e metanol 100%, sucessivamente. Após eluição do

cartucho, as amostras sofreram evaporação da fração metanólica 100% até 50% do volume inicial. Essa fração foi passada através de um cartucho de sílica, que foi eluído com metanol 100% e uma solução de água deionizada:TFA (Ácido Trifluoracético):metanol (10:0,1:89,9 v/v). A fração de TFA foi totalmente evaporada, ressuspensa em metanol 50% e, após filtração em filtro de nylon (0,45 μm), foi submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Harada in Watanabe *et al.*, 1996; Tsuj *et al.*, 1994).

O sistema de HPLC usado foi Shimadzu com uma coluna de fase reversa Lichrospher 100, C-18 (4mm X 12,5mm, ODS 5 μm), e a separação da molécula investigada foi realizada sob condição isocrática com a fase móvel de 20mM de acetato de amônia (pH 5) e acetonitrila (7:3). O volume injetado foi de 20 μL e o fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os picos tóxicos foram detectados com absorção UV a 238 nm, usando um detector de fotodiodo Shimadzu SPD-M 10A.

4 - Experimentos com *Microcystis aeruginosa*

As amostras de cianobactérias foram coletadas do ambiente natural em garrafas de 2L e transportadas para o laboratório para realizar o isolamento das cepas.

As cepas de *Microcystis aeruginosa* foram isoladas por meio de plaqueamento em meio ASM-1 sólido, e/ou isolamento por capilar de vidro em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964).

4.1 – Isolamento em meio sólido

Uma solução de ágar a 2% foi preparada em água deionizada e aquecida em placa térmica até atingir a temperatura de 86° C. Após esfriamento, o material foi lavado por 5 dias em água deionizada para retirar potenciais agentes inibidores do crescimento de cianobactérias (Allen e Gorham, 1981 citados em Shirai *et al.*, 1989).

O meio de crescimento ASM-1 com concentração de nutrientes duplicada, previamente autoclavado, foi adicionado ao ágar. Este também foi previamente autoclavado e distribuído em placas de Petri autoclavadas. Ao final dessa operação a concentração do ágar tornou-se 1% e a do meio atingiu sua concentração normal. Após esfriamento, 100 μL de amostras de fitoplâncton do ambiente natural, previamente diluídas, foram espalhadas sobre as placas com o auxílio de um bastão de vidro.

Com o surgimento das primeiras colônias nas placas, procedeu-se à transferência dessas para tubos de ensaio contendo o meio ASM-1.

4.2 – Isolamento com capilar de vidro

Essa técnica consiste em retirar-se ao microscópio uma alíquota da amostra, contendo a espécie desejada. Após lavagens sucessivas em gotas do meio de crescimento, procede-se ao isolamento do organismo, com o auxílio de um capilar de vidro que deve ter a ponta encostada rapidamente ao lado da região de interesse na lâmina. Esse procedimento propicia um maior índice de contaminação da cepa isolada.

4.3 – Seleção da cepa NPLJ-37

Algumas das cepas de *M. aeruginosa* isoladas da Lagoa de Jacarepaguá foram testadas quanto à toxicidade por HPLC ou por meio de bioensaio e quanto ao crescimento em condições de salinidade. Embora outras cepas tivessem demonstrado maior crescimento, a NPLJ-37 foi a de maior toxicidade, o que motivou sua escolha.

4.4 - Bioensaios em camundongos

Foram realizados bioensaios com camundongos Swiss, para verificar a toxicidade. Os bioensaios foram usados, em geral, em cepas nas quais não se realizou a análise por HPLC.

As amostras das culturas de cada cepa foram retiradas após atingirem o início da fase exponencial de crescimento. Posteriormente, essas amostras foram liofilizadas e ressuspensas em concentrações crescentes em solução salina 0,9%. As soluções foram preparadas para injeções intraperitoneais. Os sintomas e o tempo de ocorrência da morte dos camundongos foram observados. Os animais mortos tiveram os fígados retirados rapidamente e pesados para a verificação da hepatotoxicidade.

4.5 – Condições de cultivo nos experimentos com *M. aeruginosa*

Os cultivos foram realizados em sistema fechado (tipo “Batch”), com aeração constante em meio ASM-1, em temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, sob intensidade luminosa de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h. O inóculo inicial foi sempre de 2×10^5 células. mL^{-1} .

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição testada. A cepa NPLJ-37 foi previamente adaptada à cada salinidade por 15 dias. As condições testadas foram a salinidade (controle – 0S, condição 1 – 2S, condição 2 – 5S e condição 3 – 10S) e o meio de cultivo (ASM-1 com NaCl ou ASM-1 feito com água do ambiente natural). Foram analisados os seguintes parâmetros:

4.5.1 - Crescimento Celular

Este parâmetro foi analisado nas condições 0S, 2S, 5S e 10S no meio ASM-1 com NaCl, no meio ASM-1 com água da lagoa em presença de *Eichhornia crassipes* e no meio ASM-1 com água da lagoa sem *Eichhornia crassipes*, macrófita aquática abundante na Lagoa de Jacarepaguá durante o período estudado.

O crescimento foi estimado pela densidade da população em microscópio ótico, utilizando hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal.

O tempo de duração do experimento foi determinado em função da curva de crescimento obtida a partir das amostragens em dias alternados para a quantificação da população. Dessa forma, o tempo de duração variou para cada condição de salinidade, sempre terminando no início da fase estacionária de crescimento.

A taxa máxima ($\mu_{m\acute{a}x.}$) e o tempo de duplicação (G) foram estimados de acordo com Fogg e Thake (1987).

4.5.2 - Concentração de Clorofila a

A clorofila a foi analisada nas condições 0S, 2S, 5S e 10S no meio ASM-1 com NaCl. As amostras foram centrifugadas a 1600g por 5 min (centrífuga Fanen – modelo 206-R). O material precipitado recebeu 5 mL de metanol 100%, e foi agitado em Vortex. A suspensão foi novamente centrifugada e então analisada em espectrofotômetro a 665nm (Shimadzu-modelo UV-1601). Foi usado para o cálculo o coeficiente de extinção proposto por Mackinney (1941).

4.5.3 - Concentração de Carboidratos Intra e Extracelulares

O carboidrato intra e extracelulares foram analisados nas condições 0S, 2S, 5S e 10S no meio ASM-1 com NaCl, de acordo com Myklestad e Haug (1972).

O carboidrato intracelular foi quantificado a cada 3 dias. Um volume conhecido das amostras foram filtrados em borosilicato, sendo os filtros acondicionados em tubos de ensaio. Foi adicionado 1mL de H₂SO₄ 80% aos tubos de ensaio que foram guardados por 24 h. Após esse período, foram adicionados aos tubos 6mL de água destilada em banho de gelo e as amostras foram centrifugadas. Foi colocado em um tubo de ensaio 1mL do sobrenadante ao qual foram acrescentados 0,25mL de fenol 3% e 2,5mL H₂SO₄ concentrado. Após esfriamento as amostras foram analisadas por método espectrofotométrico.

As amostras para determinação do carboidrato extracelular foram coletadas a cada 3 dias. Colocou-se 1mL das amostras filtradas em filtro de borosilicato em tubos

de ensaio e seguiu-se procedimento semelhante ao realizado para a determinação do carboidrato intracelular.

A determinação foi realizada por espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 1601, no comprimento de onda de 485 nm, e o cálculo da concentração foi realizado a partir da construção de uma curva padrão de glicose.

4.5.4 - Extração e Detecção de Microcistina

Foi verificada a concentração de microcistina (MC) presente nas células e dissolvida na água.

Com exceção dos cultivos com aguapé, que foram finalizados no 10º dia, os demais experimentos terminaram no início da fase estacionária de crescimento celular e o meio de crescimento filtrado em filtro de borosilicato.

5 - Experimentos com *Eichhornia crassipes*

A presença desta macrófita aquática foi freqüente no ambiente estudado, o que nos levou a considerar sua possível influência sobre a população de *M. aeruginosa*.

A influência de *E. crassipes* (aguapé) sobre o crescimento e toxicidade da cepa NPLJ-37 foi testada, variando-se a salinidade nas mesmas concentrações anteriores (0S; 2S; 5S e 10S). A influência da salinidade sobre o crescimento de *E. crassipes* foi avaliada testando-se as mesmas condições de salinidade.

O cultivo foi realizado em meio ASM-1 com água da lagoa por 10 dias, em presença e em ausência de *M. aeruginosa* e o crescimento da macrófita aquática foi avaliado a partir da variação do peso úmido, expresso em gramas.

As plântulas de aguapé foram acondicionadas em recipientes plásticos transparentes (PET). Cada recipiente recebeu uma plântula de comprimento entre 7 e 13 cm. Cada uma das condições de crescimento foi testada em triplicata. A cada 2 dias recolhia-se as plântulas de *E. crassipes* para serem pesadas. As plântulas eram posteriormente devolvidas aos recipientes originais.

6 - Análise Estatística

Análise de correlação (Coeficiente de Pearson) foi realizada entre a biomassa das principais classes taxonômicas e algumas variáveis ambientais e entre a biomassa de *M. aeruginosa* e essas variáveis. Foram considerados apenas os valores obtidos a um nível de significância de 5%.

Com o objetivo de testar a diferença entre os valores obtidos para as variáveis analisadas em cada condição de crescimento (salinidade 0S, 2S, 5S e 10S) e entre as

mesmas condições nos diferentes experimentos (presença e ausência de *M. aeruginosa* ou presença e ausência de *E. crassipes*) foram realizadas análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey (comparação das médias), considerando-se um nível de significância de 5% entre as médias dos dados de taxa máxima de crescimento de *M. aeruginosa* (μ máx.), de rendimento máximo de *Eichhornia crassipes* (R) e da concentração de microcistinas normalizada para 10^6 células (MC/ 10^6).

Os valores de MC/ 10^6 obtidos no cultivo com meio ASM-1 e água da lagoa em presença de *E. crassipes* foram comparados com os valores obtidos no meio sem *E. crassipes* por meio do Teste t.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS 8,0 Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I - Dominância de Cianobactérias em uma Lagoa Costeira Tropical Hipereutrífica (Lagoa de Jacarepaguá -RJ, Brasil)

A Lagoa de Jacarepaguá é um ambiente oligohalino (0 a 10S), raso (média de 1,5m nos pontos coletados), sujeito aos freqüentes ventos de região costeira, o que garante mescla diária da coluna d' água. A lagoa vem passando por um acelerado processo de eutrofização artificial, em função da importante descarga de rejeitos que recebe de área urbana e industrial através da bacia de drenagem. Segundo os critérios da OECD (1982), a partir dos dados de clorofila *a* e transparência da água (disco de Secchi), é classificada hoje como um ambiente hipereutrífico.

Considerando o conjunto das variáveis bióticas (biomassa e composição taxonômica do fitoplâncton) e abióticas (temperatura, salinidade, transparência da água e nutrientes) na Lagoa de Jacarepaguá, foi possível reconhecer três períodos ao longo do ciclo anual estudado (08/96 a 09/97), revelando um padrão trimodal.

Apesar das principais características dos períodos serem as mesmas para os três pontos da laguna, a variação temporal de biomassa e composição taxonômica e mesmo os teores de nutrientes não coincidiram entre as três áreas estudadas. A heterogeneidade horizontal do fitoplâncton pôde ser observada quanto a biomassa e quanto à composição da comunidade fitoplanctônica (Fig. 3 e Tab. 1). A biomassa foi maior na estação 3 (Arroio Pavuna) e menor na estação 1 (Rio Marinho). Esse fato demonstrou claramente o condicionamento de uma distribuição espacial à hidrodinâmica do ambiente. Tal distribuição também respondeu a um gradiente trófico, uma vez que a porção mais continental é a que recebe menor despejo de origem doméstica. O desenvolvimento da biomassa fitoplanctônica respondeu nitidamente a esse gradiente, tendo sido possível sua determinação visual, sem dificuldade, na maioria das coletas.

Foi marcante o aumento de biomassa ao final dos estudos, coincidindo com menores valores de temperatura (Fig. 4), que pode ter sido um fator de influência nessa resposta. A dinâmica de biomassa em ambientes hipereutríficos está absolutamente sujeita a eventos abruptos e imprevisíveis, que condicionam uma seqüência de espécies controlada por fatores externos, que podem trazer crescimento ou queda de biomassa de várias ordens de grandeza (Alvarez Cobelas e Jacobsen, 1992; Smayda, 1980).

Não foi observado um gradiente de salinidade na Lagoa de Jacarepaguá (Fig. 5),

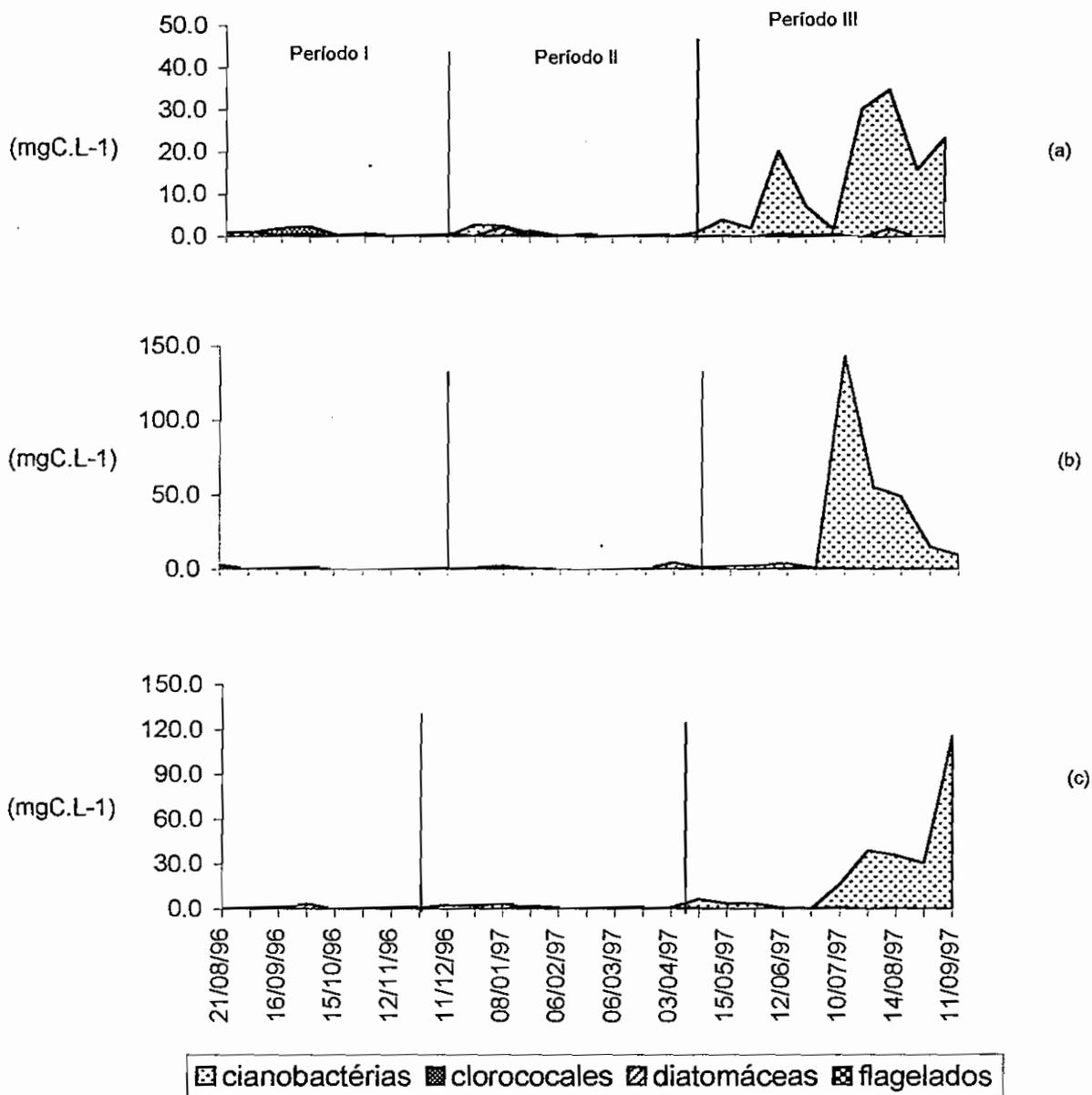


Figura 3 - Biomassa dos grupos taxonômicos (mgC.L^{-1}) nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2 e (c) Estação 3.

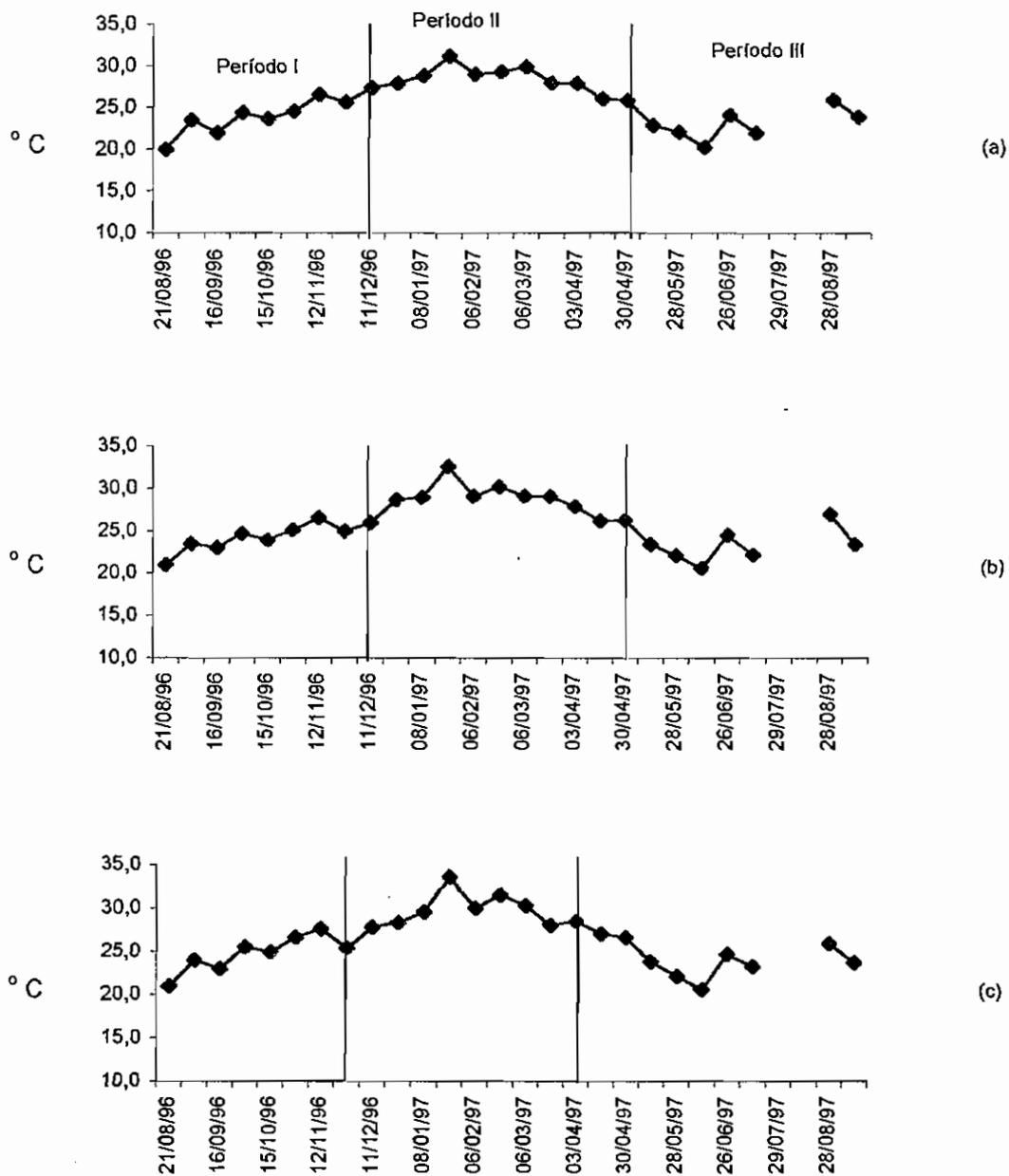


Figura 4 - Variação da temperatura (°C) nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período estudado.

como observado normalmente em ambientes de transição entre águas continentais e o mar. É possível que a distância (aproximadamente 15 km) entre o local estudado e o Canal da Joatinga, de entrada de água do mar, seja uma das causas. Os valores de salinidade foram bastante similares entre os três pontos de coleta.

O primeiro período – Período I (de 21/08/96 até 11/12/96) foi marcado pelos mais baixos valores médios de biomassa do fitoplâncton (Tab. 1). A contribuição relativa das classes demonstrou dominância de clorofíceas, mais especificamente de clorococales e quase ausência de cianobactérias (Tab. 1). Foi também importante neste período a contribuição de diatomáceas e flagelados nos três pontos de coleta (Tab. 1).

O período II (de 23/12/97 a 30/04/97) apresentou pequena elevação da biomassa e da contribuição relativa de cianobactérias (Tab. 1 e Fig. 3), embora clorofíceas e diatomáceas ainda apresentassem importante contribuição relativa. A discreta elevação de biomassa deveu-se quase que exclusivamente ao crescimento de cianobactérias, tendo clorococales, diatomáceas e flagelados (principalmente prasinofíceas, criptofíceas e crisofíceas) apresentado ligeiro declínio nos valores médios de biomassa em relação ao período anterior.

O período III (15/05/97 a 11/09/97) caracterizou-se pelo desenvolvimento máximo de biomassa, causado pelo incremento de cianobactérias, particularmente *Microcystis aeruginosa*, mas também com alguma contribuição de *Aphanizomenon* sp. e mínimas contribuições relativas dos demais grupos taxonômicos. A biomassa média de cianobactérias nos três pontos amostrados para o período representou 87% do total fitoplanctônico (Tab. 1 e Fig. 3).

Os flagelados da Lagoa de Jacarepaguá (prasinofíceas, crisofíceas, dinoflagelados e criptofíceas), aqui detectados, são caracteristicamente freqüentes e abundantes em lagoas costeiras (Caljon, 1983; Comín, 1984; Menezes e Domingos, 1994) e em ambientes eutrofizados em geral (Alvarez-Cobelas e Jacobsen, 1992).

No primeiro período, os valores de nitrato (Fig. 6) e fosfato (Fig. 7) foram máximos e os valores médios de amônia (Fig. 8) foram os mais baixos do estudo, enquanto que o período III foi marcado por elevados teores de amônia, elevação da salinidade e queda de temperatura. As concentrações de nitrato e fosfato mantiveram-se baixas.

As clorofíceas foram nitidamente favorecidas pelas maiores concentrações de nitrato e de fosfato encontrados no período I, como constatado através da correlação

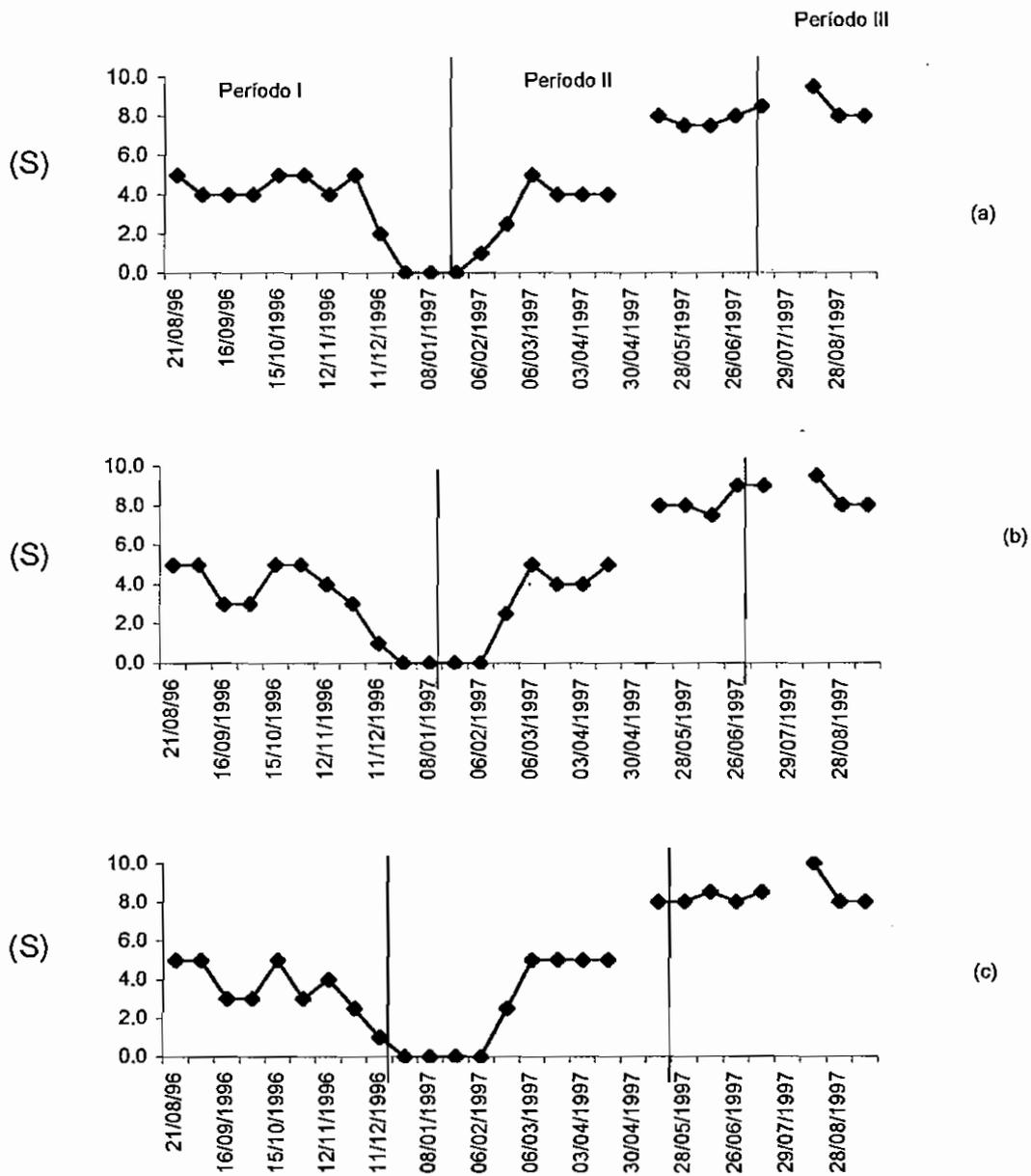


Figura 5 - Variação da salinidade (S) nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período estudado.

Tabela 1 – Valores médios de biomassa e contribuição relativa das principais classes para cada período nas três estações de coleta.

		Biomassa (mg C/L)						Porcentagem (%)					
		total	cianobactérias	clorococales	diatomáceas	flagelados	total	cianobactérias	clorococales	diatomáceas	flagelados		
Período I (21/08-11/12)	Estação 1	1,88	0,06	1,14	0,28	0,40	1,46	75,10	6,32	17,12			
	Estação 2	1,77	0,10	0,85	0,51	0,31	8,48	40,94	31,43	19,84			
	Estação 3	2,69	0,25	1,28	0,78	0,38	3,22	66,52	14,40	15,85			
Período II (23/12-30/04)	Estação 1	1,96	0,98	0,36	0,40	0,22	40,36	27,13	16,30	16,09			
	Estação 2	1,71	1,23	0,26	0,15	0,08	59,48	27,36	7,93	5,56			
	Estação 3	2,70	1,41	0,71	0,35	0,22	45,48	32,24	13,08	9,20			
Período III (15/05-11/09)	Estação 1	16,48	15,69	0,07	0,55	0,15	91,21	0,86	5,26	2,62			
	Estação 2	32,31	31,56	0,06	0,58	0,11	89,31	1,26	8,07	1,36			
	Estação 3	24,25	23,41	0,08	0,62	0,14	81,46	2,34	11,56	4,64			

positiva com a concentração de nitrato e com a do fósforo solúvel reativo, observada nas 3 estações de coleta (Tab. 3).

A influência dos elevados teores de fosfato no desenvolvimento de clorococales já foi observada em outros ambientes costeiros fluminenses (Domingos *et al.*, 1994), bem como em vários outros ambientes tropicais hipereutróficos rasos brasileiros (Huszar *et al.*, 2000). Esta relação também tem sido assinalada para ambientes rasos e turbulentos de regiões temperadas (Jensen *et al.*, 1994; Trimbee e Prepas, 1987). A ausência de limitação por P, gerando condições favoráveis para clorofíceas, também foi observada por Sommer (1988).

A literatura registra os elevados valores de nutrientes essenciais como condição favorável ao desenvolvimento de clorofíceas, inclusive clorococales, desde que sejam também favoráveis as condições de luz e profundidade da camada de mistura (Happey-Wood, 1988). Blomqvist *et al.* (1994) propõem que a disponibilidade de N sob a forma de nitrato representa um fator favorável ao desenvolvimento de células eucariontes. Para Sommer (1988), clorofíceas e cianobactérias são melhores competidores por nitrogênio, enquanto diatomáceas por P.

Os valores de Z_{eu}/Z_{max} na Lagoa de Jacarepaguá (Tab. 2) não estiveram significativamente associados com as clorofíceas, ao contrário do observado para cianobactérias, que se correlacionaram negativamente com Z_{eu}/Z_{max} na estação 3. Resultados semelhantes foram encontrados por Jensen *et al.* (1994).

A relação Z_{eu}/Z_{max} não pôde explicar a substituição de clorofíceas por cianobactérias, nem o predomínio de clorofíceas, uma vez que o período II, de maior penetração de luz na lagoa (Fig. 9), e portanto de maior Z_{eu}/Z_{max} , não correspondeu ao máximo de clorofíceas, como observado pelas análises de correlação. Entretanto, os menores valores da biomassa de clorofíceas estiveram associados ao período de menor penetração de luz, ocorrido no período III. Se por um lado a maior penetração de luz na coluna d'água não se mostrou um fator determinante para o desenvolvimento de clorofíceas, os resultados mostraram que sua diminuição teve forte efeito negativo.

As clorofíceas da Lagoa de Jacarepaguá estiveram representadas por organismos típicos de ambientes hipereutróficos, predominantemente clorococales, considerado o mais diverso grupo do fitoplâncton hipereutrófico (Alvarez Cobelas e Jacobsen, 1992).

Sistemas hipereutróficos têm como componentes representantes de clorococales

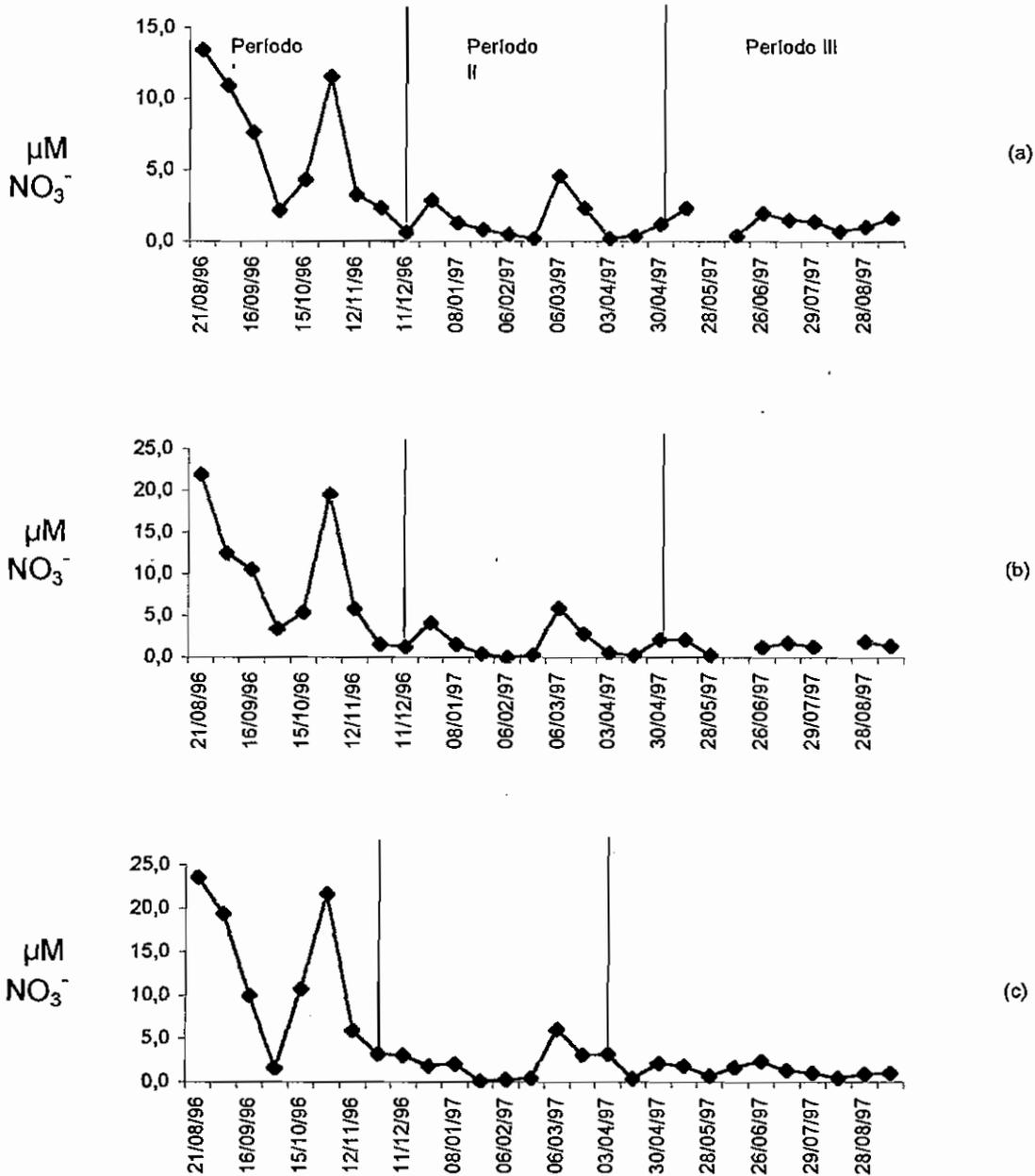


Figura 6 - Variação da concentração de nitrato ($\mu\text{M-NO}_3^-$) nas três estações de coleta: (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período de estudo.

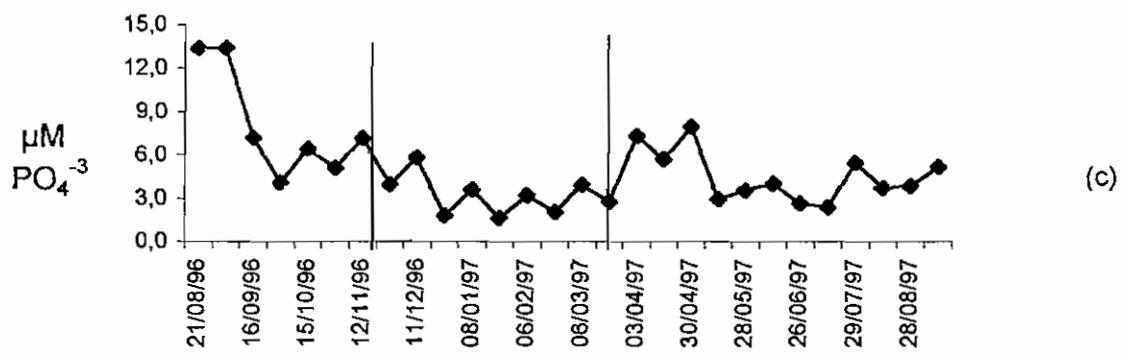
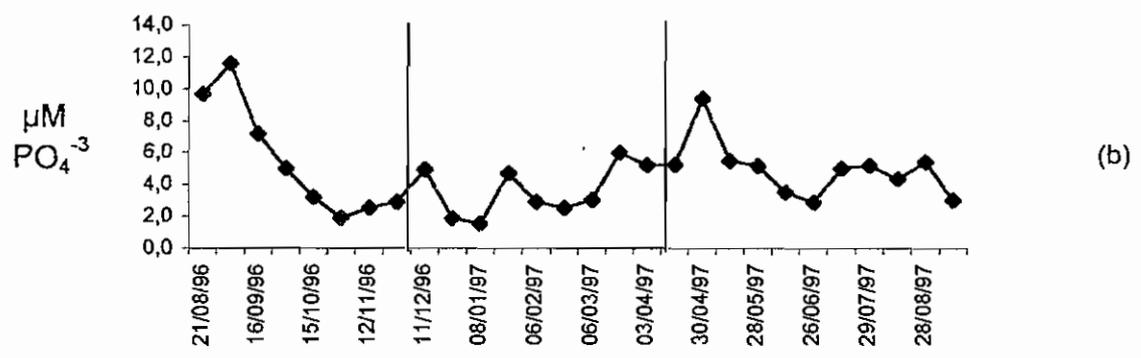
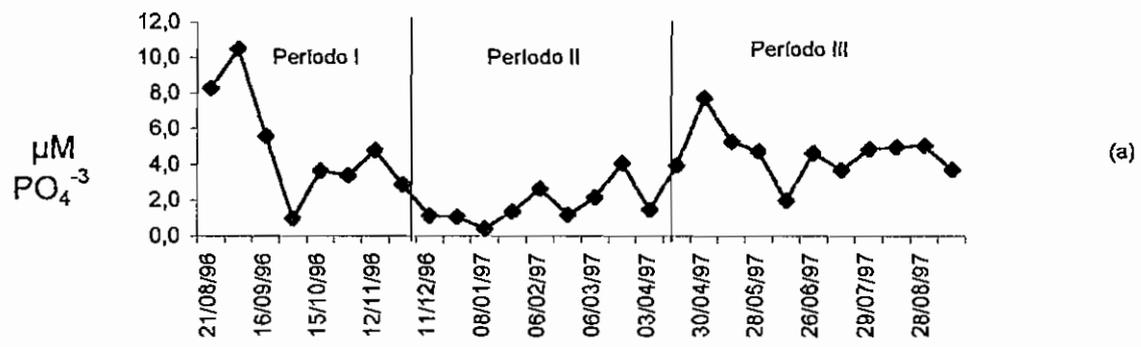


Figura 7 - Variação da concentração de fosfato ($\mu\text{M-PO}_4^{-3}$) nas três estações de coleta (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período estudado.

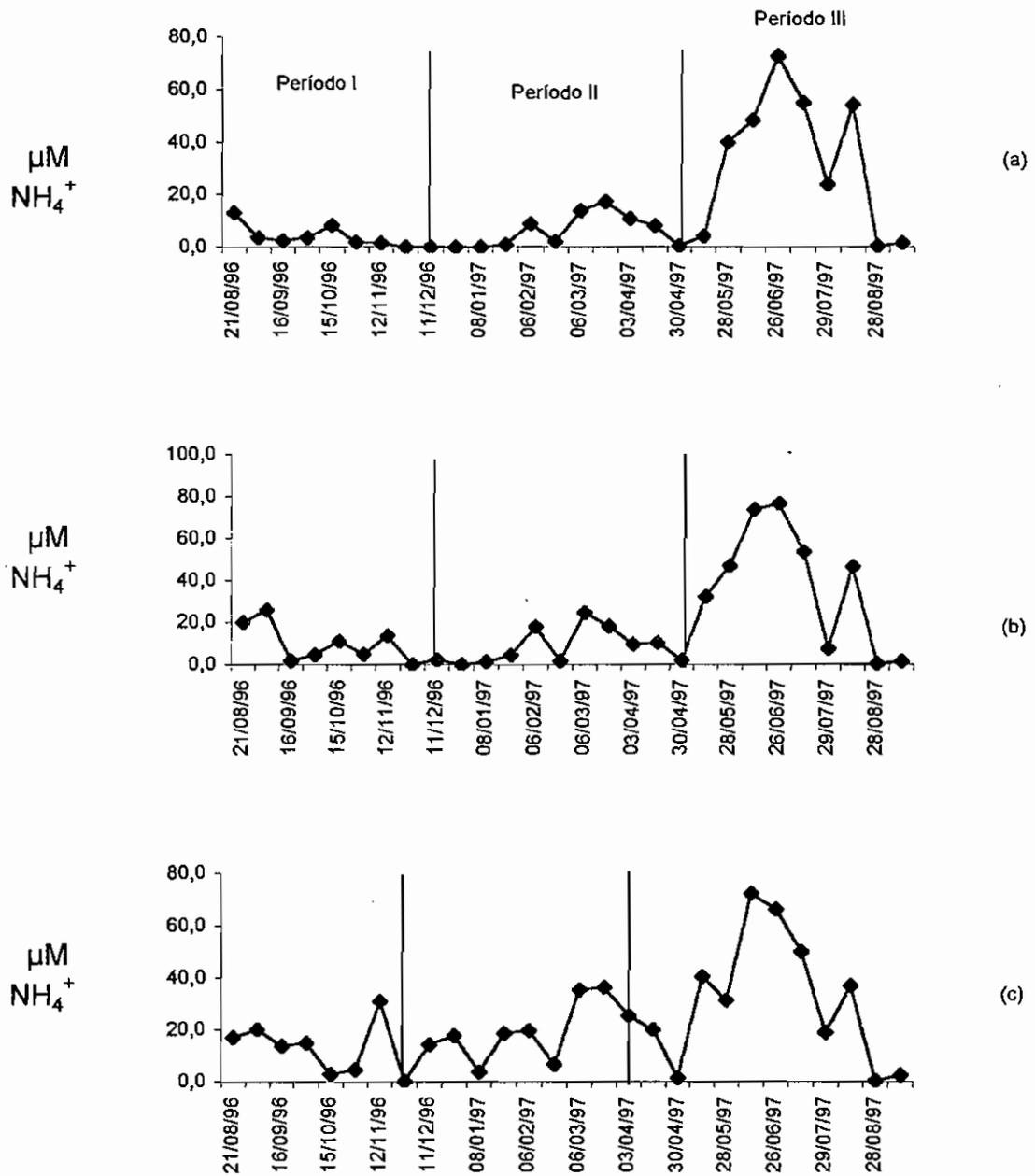


Figura 8 -Variação da concentração de amônia ($\mu\text{M-NH}_4^+$) nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período estudado.

os gêneros *Ankistrodesmus*, *Crucigenia*, *Scenedesmus*, *Tetrastrum* (Reynolds, 1984), organismos observados em Jacarepaguá com elevada freqüência no presente estudo. Acrescentam-se neste trabalho os gêneros *Coelastrum*, *Monoraphidium*, *Oocystis* e *Tetraedron*.

O domínio de clorococales no período I caracterizou o sucesso desses organismos na Lagoa de Jacarepaguá. Certamente foi determinante a conjugação de fatores como a circulação contínua da coluna d' água, a boa penetração de luz com escassa profundidade e a baixa salinidade do período, associados ao altos teores de nutrientes essenciais, principalmente nitrogênio-NO₃ e fósforo. Tais condições propiciaram um bom crescimento às clorococales, cuja estratégia de sobrevivência caracteriza-se por rápido crescimento e absorção de nutrientes e alta taxa de fixação de C (Haphey-Wood, 1988).

Diversos autores apontam a necessidade de mescla e transparência na camada do epilimnion (Haphey-Wood, 1988; Jensen *et al.*, 1994) para o sucesso destes organismos, pois dessa forma ficam garantidas sua flutuação, além de alta incidência de luz e alto teor de nutrientes. O ambiente raso e exposto a ventos freqüentes, recebendo despejos domésticos, que caracteriza as lagoas costeiras seria a conjunção adequada para a expansão de clorococales. Entretanto, nem sempre isso foi verificado. Entre as lagoas costeiras fluminenses, o eventual desenvolvimento maciço de clorococales costuma estar associado a eventos rápidos e repentinos (Domingos *et al.*, 1994). No período estudado, a Lagoa de Jacarepaguá demonstrou maior riqueza e freqüência de representantes das clorococales, do que outras lagoas brasileiras de maior salinidade como Saquarema (Domingos, 1991), Maricá (Domingos *et al.*, 1994), Guarapina (Knoppers e Moreira, 1990) e Patos (Yunes, 2000).

A salinidade é de importância fundamental no controle do desenvolvimento do fitoplâncton costeiro e em sua composição (Caljon, 1983), e este pode ter sido um fator condicionador do escasso desenvolvimento de clorofíceas no período II e, principalmente, no período III (Tab. 1).

No caso da Lagoa de Jacarepaguá, a substituição de clorococales por cianobactérias observada do período I para o período II não esteve associada ao aumento de Z_{eu}/Z_{max} . Entretanto, além dos nutrientes, outros fatores podem contribuir para uma explicação conclusiva sobre a redução de clorofíceas e sua substituição por cianobactérias no final do primeiro período.

Tabela 2 – Valores médios de algumas variáveis abióticas para cada período nas três estações de coleta. As variáveis consideradas foram temperatura (Temp.); razão da profundidade da zona eufótica pela profundidade máxima (Zeu/Zmáx.); profundidade máxima (Prof. Máx.); pH; salinidade; fosfato (PO_4^{-3}); nitrato (NO_3^-); nitrogênio inorgânico dissolvido (NID); a razão nitrogênio inorgânico dissolvido/ fosfato (NID/ PO_4^{-3}) e o oxigênio dissolvido (OD).

	Estação 1			Estação 2			Estação 3		
	Período I (21/08-11/12)	Período II (23/12-30/04)	Período III (15/05-11/09)	Período I (21/08-11/12)	Período II (23/12-30/04)	Período III (15/05-11/09)	Período I (21/08-26/11)	Período II (11/12-03/04)	Período III (17/04-11/09)
Temp. (°C)	24,20	28,40	23,68	24,31	28,82	23,31	24,75	29,73	24,18
Zeu/Zmáx.	0,34	0,47	0,26	0,33	0,60	0,37	0,32	0,47	0,33
Prof. Máx. (m)	1,81	1,89	1,40	1,50	1,22	1,26	1,40	1,30	1,39
pH	7,65	7,30	7,76	8,22	8,23	8,24	8,40	7,93	8,22
Salinidade	4,22	2,28	8,13	3,78	2,28	8,38	3,81	2,06	8,00
PO_4^{-3} (μM)	4,59	2,62	4,34	5,45	4,25	4,44	7,60	3,57	4,31
NO_3^- (μM)	6,26	1,45	1,37	9,14	1,81	1,40	12,02	2,25	1,26
NH_4^+ (μM)	3,84	6,24	33,26	9,43	9,05	37,73	13,03	19,80	30,95
NID (μM)	11,47	9,42	35,34	21,08	13,24	10,02	27,19	23,71	33,33
NID/ PO_4^{-3}	2,87	4,34	9,35	5,13	3,50	10,02	4,02	7,89	10,06
OD (mg.L^{-1})	6,64	6,44	4,59	7,88	10,31	9,17	7,71	6,24	8,91

Tabela 3 - Coeficiente de correlação (r) entre a biomassa das classes taxonômicas e algumas variáveis abióticas, mostrando os valores significantes ($p < 0,05$) para as três estações separadamente e para as três estações em conjunto.

Estação 1	PROF.	SAL	D.S.	CLO a	TEMP.	O.D.	pH	fosfato	nitrato	amoníaco	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ⁻³
	n=26	n=26	n=26	n=25	n=26	n=23	n=28	n=28	n=27	n=28	n=26	n=27
	Biomassa total	0,56	-0,43	0,40	-0,32					0,41	-0,32	0,30
	Cyanobactérias	0,59	-0,40	0,38	-0,30					0,42	-0,31	0,30
	Clorofíceas				-0,31				0,72	-0,33		
	Diatomáceas	0,45		-0,46	0,46		0,40		-0,30			-0,40
Flagelados					-0,34			0,43	0,57			
Estação 2	PROF.	SAL	D.S.	CLO a	TEMP.	O.D.	pH	fosfato	nitrato	amoníaco	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ⁻³
	n=26	n=26	n=26	n=25	n=26	n=23	n=28	n=28	n=27	n=28	n=26	n=27
	Biomassa total	0,43				0,30				0,32		
	Cyanobactérias	0,43								0,32		
	Clorofíceas	0,90						0,54	0,69	0,37	-0,35	
	Diatomáceas	0,30				-0,44				0,37	-0,56	
Flagelados	0,61				-0,35		0,44	0,48		-0,46		
Estação 3	PROF.	SAL	D.S.	CLO a	TEMP.	O.D.	pH	fosfato	nitrato	amoníaco	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ⁻³
	n=26	n=26	n=26	n=25	n=26	n=23	n=28	n=28	n=27	n=28	n=26	n=27
	Biomassa	0,40	-0,42								-0,40	
	Cyanobactérias	0,40	-0,40								-0,39	
	Clorofíceas	-0,41						0,55	0,67			
	Diatomáceas	-0,31		-0,35			0,49					
Flagelados							0,61	0,68				
Todos os pontos	PROF.	SAL	D.S.	CLO a	TEMP.	O.D.	pH	fosfato	nitrato	amoníaco	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ⁻³
	n=78	n=78	n=78	n=75	n=78	n=69	n=84	n=84	n=81	n=84	N=78	n=81
	Biomassa	0,41	-0,29		-0,21						-0,22	
	Cyanobactérias	0,41	-0,28		-0,20						-0,21	
	Clorofíceas	-0,30						0,32	0,43			
	Diatomáceas			-0,42			0,23	0,32			0,29	-0,38
Flagelados					-0,38		0,47	0,53			0,29	

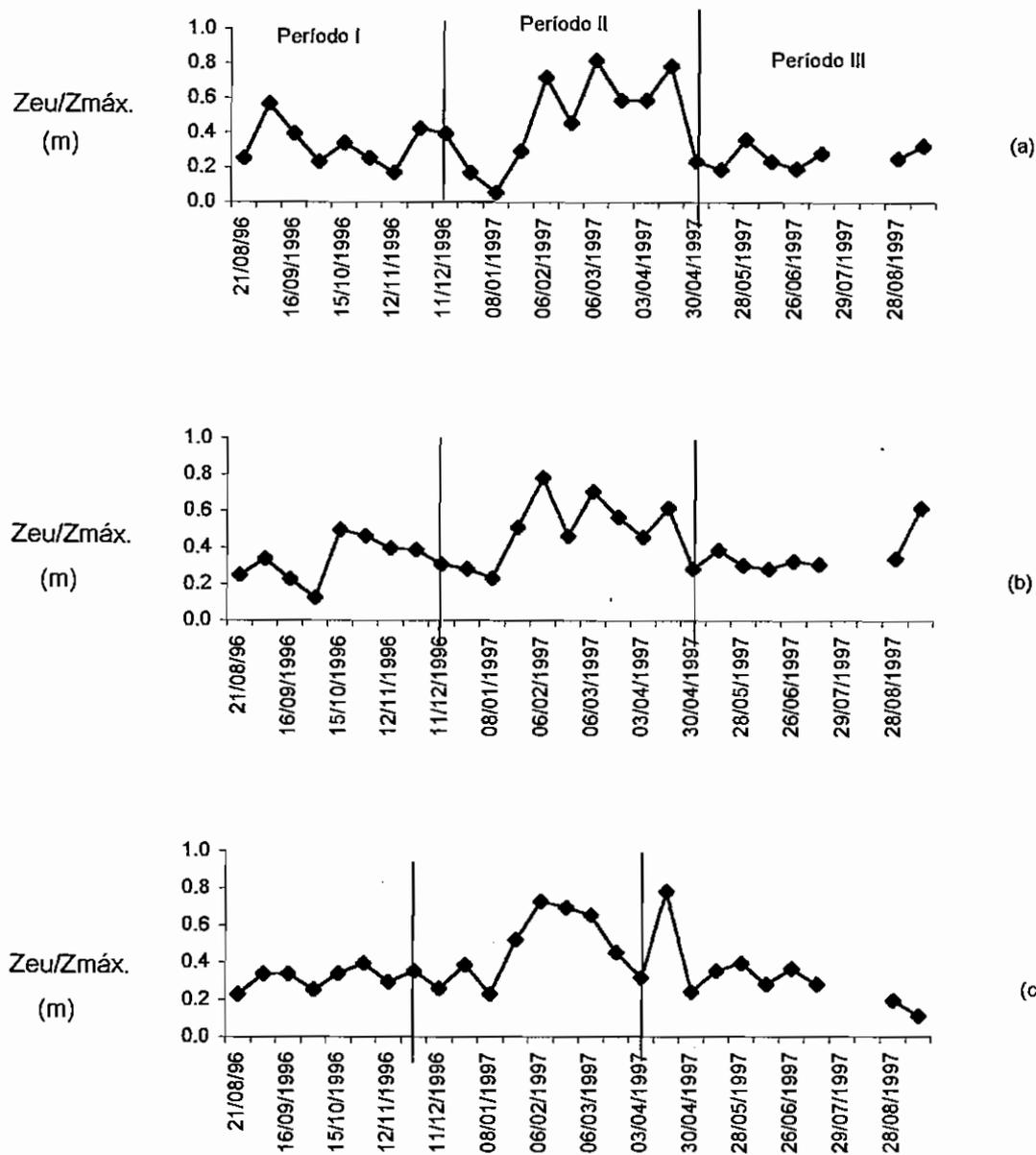


Figura 9 - Variação dos valores de $Z_{eu}/Z_{máx.}$ (m) nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 durante o período estudado.

O balanço entre a taxa de crescimento de clorococales e a taxa de perda vem sendo apontado, na literatura, como o processo responsável pelo sucesso ou não desse grupo no ambiente natural (Haphey-Wood 1988; Jensen *et al.*, 1994). Dentre as causas de perda destacam-se principalmente a herbivoria, por serem em geral muito palatáveis, e as taxas de sedimentação, uma vez que esses organismos são desprovidos de aparatos especiais para a flutuação (flagelos, mucilagem, etc).

Resultados da composição e biomassa da comunidade zooplanctônica coletada no mesmo período (Ferrão-Filho, 1998) indicam que as taxas de crescimento, especialmente de cladóceros, foram sustentadas pelo decaimento das populações de clorofíceas e diatomáceas.

A correlação negativa entre a população de cladóceros (principalmente *Moina micrura*) e densidade de clorofíceas ($r = -0.7552$; $p < 0.005$) e diatomáceas ($r = -0.6262$; $p < 0.005$) na Lagoa de Jacarepaguá foi documentada por Ferrão-Filho (1998). Cabe salientar que, ao contrário das cianobactérias, as clorofíceas e diatomáceas são consideradas alimento de boa qualidade nutritiva para o zooplâncton, principalmente quanto ao teor de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs – Polyunsaturated Fatty Acids) e quanto à digestibilidade de clorofíceas (Kilham *et al.*, 1997). Tais características garantem condições de alimento disponível capazes de sustentar o crescimento da comunidade zooplanctônica, cujo desenvolvimento, às custas do consumo de clorofíceas e diatomáceas, deve ter tido importante papel na substituição das espécies da comunidade fitoplanctônica de Jacarepaguá.

Cabe destacar que as concentrações de N e P inorgânico dissolvido diminuíram no final do período I abaixo dos valores mínimos citados na literatura ($N = 20 \mu M$ e $P = 0,1 \mu M$) para suportar o crescimento celular (Reynolds, 1997), coincidindo com salinidade zero e com substituição de clorofíceas por cianobactérias.

A herbivoria como fator de perda e os teores de nutrientes como limitação para o crescimento, provavelmente representaram as causas do insucesso de clorofíceas ao final do período I.

A biomassa de diatomáceas esteve relacionada positivamente com a profundidade da lagoa e com a clorofila a (ponto 1), com amônia (ponto 2) e com pH (ponto 3) (Tab. 3).

A correlação foi negativa com Z_{eu}/Z_{max} (ponto 1 e 2), fosfato (ponto 1) e com temperatura (ponto 2) (Tab. 3).

A elevação de Z_{eu}/Z_{max} associada ao declínio de diatomáceas revelou o favorecimento desse grupo por menor transparência da água. O baixo requerimento por luz de diatomáceas (Sommer, 1988; Reynolds, 1997) explica esse resultado.

As baixas concentrações de fósforo favoreceram o crescimento de diatomáceas, sobretudo na estação 1, como revelado pelos valores de correlação (Tab. 3). Este grupo de algas é considerado competidor superior por fosfato, se comparado a cianobactérias e clorofíceas (Tilman *et al.*, 1986; Sommer, 1988), podendo ter o aumento de dominância associado ao aumento da limitação por fósforo (Sommer, 1988).

Os períodos I e III foram os de maior biomassa de diatomáceas. A análise da distribuição horizontal evidenciou maior desenvolvimento na área com maior concentração de nutrientes (Estação 3 – Arroio Pavuna).

Em função da alta densidade de suas frústulas, um dos principais problemas desses organismos é evitar sua sedimentação. As condições mais favoráveis são aquelas de maior turbulência da água (Zhang e Prepas, 1996; Reynolds, 1997), que garantem sua flutuação e pode provocar, em ambientes rasos como a Lagoa de Jacarepaguá, ressuspensão de sedimento e conseqüentemente menor transparência da água. Nossos resultados indicam que o sucesso de diatomáceas na lagoa esteve associado à turbulência do ambiente, por facilitar sua manutenção na coluna d' água e à sua vantagem competitiva em condições de menor intensidade de luz.

As cianobactérias foram amplamente dominantes no período III, de maior salinidade e maiores concentrações de amônia e de NID. A dominância de cianobactérias em lagoas fluminenses tem sido freqüentemente registrada, evidenciando o incremento da eutrofização nas lagoas costeiras do Estado do Rio de Janeiro (Huszar, 1989; Knoppers e Moreira, 1990; Domingos, 1991; Domingos *et al.*, 1994 e Melo e Suzuki, 1998)

As principais causas que têm sido apontadas para o sucesso de cianobactérias nos mais variados sistemas aquáticos envolvem: elevado TP (Trimbee e Prepas, 1987; Duarte e Augustí, 1992); baixo N e alto TP, ou baixo TN/TP (Smith, 1983; Smith e Bennett, 1999); baixa intensidade luminosa (Zevenboom e Mur, 1980); alta temperatura da água (Robarts e Zohary, 1987); estratificação da coluna d' água (Reynolds, 1987; mas ver Ganf, 1974); altos valores de pH/ baixo CO_2 livre (Shapiro, 1990); habilidade para evitar a herbivoria (Sommer *et al.*, 1986); excreção de substâncias alelopáticas que suprimem o crescimento de outras algas (Fay, 1980; Keating, 1978), capacidade de reservar fósforo (Pettersson *et al.*, 1993) e habilidade para regular sua posição na coluna d' água (Reynolds, 1987).

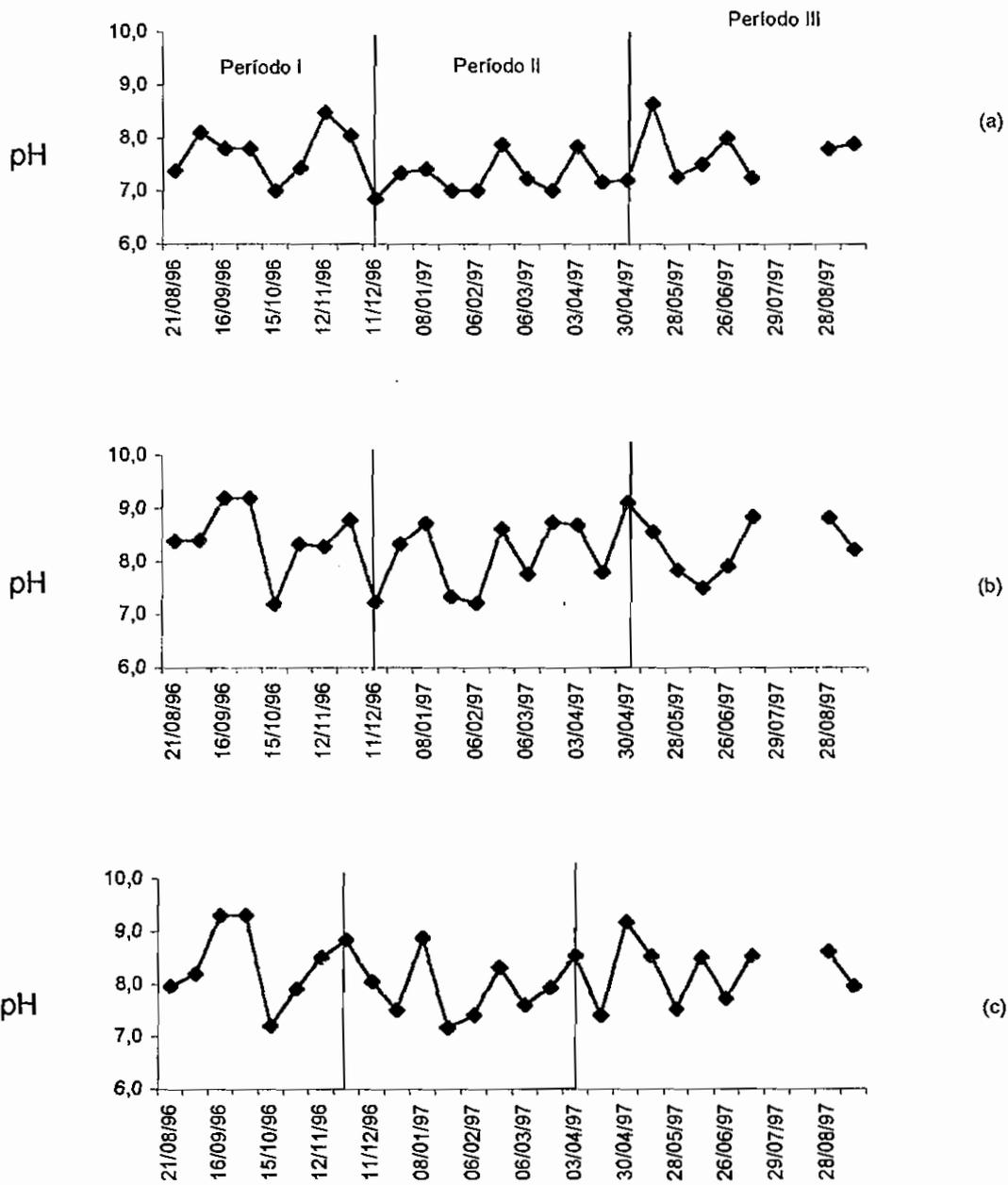


Figura 10 - Variação do pH nas três estações de coleta; (a) Estação 1; (b) Estação 2; (c) Estação 3 ao longo dos estudos.

dominância do fitoplâncton de eucariontes para cianofíceas, respondendo à variação de pH e/ou concentração de CO₂ livre, mantidas constantes as condições de N, P, nutrientes traço, luz e regime de turbulência. Tais condições, entretanto, são incompatíveis com a dinâmica dos ambientes aquáticos naturais e, além de eliminarem a influência das trocas com a atmosfera e do sedimento, também desconsideram a sinergia de outras variáveis reguladoras da composição do fitoplâncton.

É provável que a disponibilidade de CO₂ livre possa contribuir para explicar as associações do fitoplâncton que foram observadas em Jacarepaguá. A competição pelo carbono inorgânico dissolvido tem importante papel em ambientes muito produtivos como as lagoas costeiras. A capacidade de utilização do bicarbonato com eficiência é vital para espécies eutróficas em geral (Moss, 1973). A capacidade de ter uma cinética superior para absorção do CO₂ livre em baixas concentrações, ou a eficiência na utilização do bicarbonato como fonte de carbono, pode tornar-se fundamental nesses ambientes, como revelado a partir dos elevados valores de pH. É provável que a maioria das espécies abundantes e/ou freqüentes na lagoa detenhãem tal característica, haja visto os elevados valores de pH na maior parte do estudo.

O aumento de temperatura também não influenciou no desenvolvimento de cianobactérias, tendo inclusive sido registrado correlação negativa ($r = -0,30$) entre temperatura e biomassa de cianobactérias na estação 1 (Tab. 3). De fato, o máximo de desenvolvimento de cianobactérias ocorreu no período do mínimo de temperatura, o que já havia sido registrado para outra lagoa fluminense (Domingos, 1991). Cabe ainda citar os exemplos de lagos com dominância de cianobactérias na Escandinávia e até no Ártico (Blomqvist *et al.*, 1994). Entretanto, uma acentuada queda da biomassa fitoplanctônica dominada por cianobactérias foi coincidente com uma queda de temperatura no período III, quando se registrou o mínimo do estudo (20° C).

Cabe considerar, entretanto, que as cianobactérias constituem-se um grupo heterogêneo, no qual se verificam diferentes mecanismos fisiológicos, morfológicos e ecológicos (Paerl, 1988), o que pode explicar alguns resultados controversos a respeito da influência das variáveis ambientais sobre o sucesso desse grupo em condições ambientais.

As condições de menor transparência da água coincidiram com o máximo de biomassa de cianobactérias. A correlação inversa entre biomassa e Z_{eu}/Z_{max} ($r = -0,32$ e $r = -0,40$) nas estações 1 e 3 (Tab. 3) não está indicando o aumento do primeiro como causa

do segundo, pois na verdade a resposta da biomassa é posterior a diminuição da penetração de luz na coluna d'água.

A baixa luminosidade é apontada como uma das variáveis importantes para o sucesso de cianobactérias nos corpos d'água, não apenas por seu menor requerimento por esses organismos, mas também porque sua disponibilidade pode modificar a resposta de cianobactérias à razão dos recursos N/P (Smith, 1986; Smith e Bennett, 1999). Ao mesmo tempo, a habilidade das cianobactérias em protegerem-se de altas insolações pode ter um importante valor competitivo em ambientes rasos tropicais. Já foi destacada a maior velocidade das cianobactérias em relação às clorofíceas para produção de feofitina, em situações de repentina alteração da intensidade luminosa, como o provocado pela mistura vertical na coluna d'água (Schiewer, 1998), o que é previsível em um ambiente de mistura diária da coluna d'água, como a Lagoa de Jacarepaguá.

Resultados de crescimento de cianobactérias em locais turbulentos são citados por Talling (1986) em região sujeita a ventos frequentes no Lago Sibaya (África do Sul) e por Ganf (1974) no Lago George (Uganda). Este lago é sujeito a ventos fortes, sofrendo estratificação e mistura das camadas d'água diariamente. A comunidade é amplamente dominada por cianobactérias (70 a 80% da biomassa total) e os resultados quantitativos antes e após ventos fortes, revelaram aumento de duas a três vezes, em média, da densidade populacional de cianobactérias após o período dos ventos.

As cianobactérias estiveram relacionadas às baixas concentrações de nitrato ($r = -0.29$; ponto 1) e a oferta de N sob a forma de amônia ($r = 0.42$; ponto 1 e $r = 0.32$; ponto 2). Esses resultados vão de encontro ao proposto por Blomqvist *et al.* (1994), tendo sido um dos fatores que explicou a substituição das clorofíceas para cianobactérias ocorrida do período I para o período II e III.

Blomqvist *et al.* (1994) demonstraram, através de experimentos, que condições de oferta de N sob a forma de nitrato eliminaram cianobactérias e que a oferta de N sob a forma de amônia seleciona cianobactérias não fixadoras de nitrogênio molecular. A eficiência na absorção de amônia (baixo Km) explicaria sua habilidade em superar outras algas na competição por amônia. No conjunto de sistemas por eles, analisados foi observado que a depleção do nitrato ocorreu antes do começo do crescimento de cianobactérias. O mesmo foi observado no presente estudo ao final do período I e início do período II. Concentrações de nitrato acima de $20\mu\text{g/L}$ inibem o desenvolvimento de cianobactérias (Blomqvist *et al.*, 1994). Realmente, a concentração de nitrato acima de

27µg/L coincidiu com a ausência de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá no período I, as quais depois de instaladas, entretanto, foram tolerantes a valores mais elevados (Fig. 3 e Fig. 6). Porém, durante o período de máxima dominância, não se observou nenhum valor acima de 32µg/L.

A escassa habilidade de cianobactérias para assimilar nitrato, em relação às células eucarióticas, parece ser uma das razões para a ausência de cianobactérias no início do estudo. Essa deficiência deve-se à diferença na velocidade do processo de absorção de nitrato entre células eucariontes e cianobactérias, uma vez que a presença de nitrato induz a atividade da nitrato redutase mais rapidamente nas primeiras (Blomqvist *et al.*, 1994).

A biomassa máxima de cianobactérias registrada no período III esteve associada às concentrações de amônia ($r = 0,42$ na estação 1 e $r = 0,32$ na estação 2), concordando com os achados de Blomqvist *et al.* (1994) que, através da realização de experimentos e observação de ambientes naturais, registraram estímulo ao crescimento de *Microcystis* por amônia. Entretanto, estes mesmos autores destacam a baixa concentração de N como fator decisivo para a instalação e sucesso de cianobactérias e, no presente estudo, o período de maior sucesso desse grupo coincidiu com os valores mais elevados de amônia (Fig. 8).

Apesar disso, no período III, ocorreu brusca queda da biomassa de cianobactérias, enquanto a concentração de amônia estava no máximo (77µM). Tal fato foi associado à redução da temperatura, demonstrando a necessidade de considerarem-se efeitos sinérgicos ao buscar-se analisar sistemas complexos e dinâmicos como os ecossistemas aquáticos.

Ainda como possíveis causas para implantação da dominância de cianobactérias em dois lagos, Shapiro (1997) considerou a possibilidade da influência do recrutamento de formas de resistência do sedimento em condições favoráveis de nitrogênio e fósforo. Tais possibilidades já foram confirmadas para *M. aeruginosa* (Reynolds, 1987). Experimentos realizados em laboratório, com o sedimento da Lagoa de Jacarepaguá, manipulando-se a razão da oferta N/P, no entanto, não demonstraram resultados conclusivos (Domingos, dados não publ.).

Correlação positiva entre cianobactérias e salinidade ($r = 0,59$; 0,43 e 0,40 nas estações 1, 2 e 3, respectivamente) foi observada nos 3 pontos de coleta (Tab. 3). Assim como a concentração de CO₂ livre pode ser determinante para ambientes eutróficos, a salinidade é igualmente seletiva para ambientes costeiros. As características oligohalinas na maior parte do estudo certamente foram importantes para a composição da comunidade e,

muito provavelmente, o aumento de salinidade observado no Período III excluiu organismos mais sensíveis ao aumento da pressão osmótica, como foi o caso de clorococales.

Como principais características do aumento de salinidade, a partir da entrada de água do mar observada nesse período, podem ser citadas a diminuição da temperatura e da razão Z_{eu}/Z_{max} , provavelmente por ressuspensão de partículas do sedimento em razão do deslocamento da corrente mais densa no fundo.

O aumento da salinidade também contribuiu para reduzir a solubilidade do CO_2 e provavelmente seu coeficiente de difusão, embora esse decaimento seja considerado pequeno (num fator de 0,85), não sendo decisivo para a determinação do sucesso competitivo (Raven, 1991).

Entretanto, o marcado aumento da concentração de amônia no período III não poderia ser atribuído à influência da água do mar, por serem suas águas geralmente mais diluídas que as águas continentais. A observação "in situ" do ambiente estudado permitiu constatar a alta influência negativa da salinidade sobre a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (aguapé), espécie abundante até então e competidora por nutrientes dissolvidos com o plâncton. Os indivíduos dessa espécie não toleraram a salinidade alcançada no período (10S), provavelmente perdendo o turgor celular, tornando-se totalmente desidratados e, finalmente, morrendo. Provavelmente, a decomposição dessa enorme biomassa contribuiu para os elevados valores de amônia encontrados duas semanas após o aumento da salinidade que, aliás, representaram o máximo de nitrogênio inorgânico disponível (Fig. 8). Além disso, seu desaparecimento eliminou um importante competidor por recursos dissolvidos e coincidiu com o máximo de biomassa do estudo e com o máximo de cianobactérias.

A sucessão entre aguapé e cianobactérias já foi constatada de forma empírica pelos pescadores locais. Para eles a "mancha verde", agregados de células que podem ser vistos a olho nu, é chamada de semente de "gigoga". Referem-se à *Microcystis* como sementes de aguapé, por já terem observado a ausência ou diminuição do aguapé nas ocasiões de máximo desenvolvimento de *M. aeruginosa*.

Bulgakov e Levich (1999) afirmam que a concentração absoluta dos recursos determina a biomassa total, mas a razão desses recursos determina a biomassa relativa dos indivíduos. Mais especificamente, afirmam que a razão N/P é um fator independente e preponderante sobre os demais na regulação da composição nas associações do

fitoplâncton, ou seja, o fator que deverá determinar toda a distribuição do fitoplâncton nos corpos d'água.

Apesar de não ter sido possível o cálculo da razão TN/TP no presente trabalho, vários são os autores que trazem essa questão como determinante para a dominância de cianobactérias (Smith, 1986; Bulgakov e Levich, 1999). No entanto, alguns estudos refutam tal hipótese (Canfield *et al.*, 1989; Blomqvist *et al.*, 1994) e considerações mais recentes (Reynolds, 1999) apontam as razões N/P não como causa, mas efeito das comunidades que estão instaladas no meio ambiente, e do uso diferenciado que fazem dos recursos nutrientes disponíveis.

A partir dos nutrientes dissolvidos analisados, calculou-se a razão NID/PO_4^{-3} – fósforo solúvel reativo, citada por Shapiro (1997) como uma das possíveis causas para implementação de cianobactérias. Não foi possível estabelecer-se nenhuma correlação conclusiva, embora a maioria dos resultados demonstre potenciais condições de limitação por nitrogênio, com poucos valores acima de 10 (razão atômica) (Tab.2).

Interpretações que consideram apenas a razão dos nutrientes e não sua concentração disponível para os organismos como causa para a composição do fitoplâncton podem estar equivocadas; uma vez que são as concentrações e não as razões que definem a limitação de algum recurso (Reynolds, 1999). Para esse autor, as razões podem ser apenas a expressão do uso dos recursos pelo fitoplâncton presente, uma vez que existem diferenças interespecíficas na cinética de absorção dos nutrientes, ou seja, a composição do fitoplâncton seria causa das razões observadas, e não sua consequência.

As concentrações de N e P inorgânico dissolvido, que estiveram no final do período I abaixo do mínimo para suportar o crescimento celular (Reynolds, 1999) ($0,1\mu\text{M}$ para P e $20\mu\text{M}$ para N) (Figs. 6 e 8), foram as que proporcionaram a implantação de cianobactérias, resultando no crescimento da biomassa desse grupo. Crescimento de cianobactérias em concentração de P menor que $0,1\mu\text{M}$, ou seja, menor que $3\mu\text{g/L}$ já havia sido observado, levando ao questionamento desses valores estabelecidos (Mann, 1995 citado em Reynolds, 1997).

Tais resultados nos levam a refletir sobre os mínimos reais para cianobactérias e para as algas em geral, sobre a eficiência de cianobactérias na utilização de nutrientes de fontes orgânicas não analisadas no presente estudo e também na eficiência de cada grupo na utilização de nutrientes com fluxo "*in continuum*", como possíveis explicações para esses resultados.

Numa tentativa de identificar-se as estratégias da comunidade fitoplânctônica dominantes na Lagoa de Jacarepaguá, buscou-se conhecer as associações presentes nos três períodos de estudo (Tab. 4).

O primeiro período foi caracterizado pela associação **D**, que engloba pequenas diatomáceas de ambientes rasos e hipereutróficos, representada por *Cyclotella* sp., para a associação **X₁**, de nanoclorofíceas desprovidas de movimento, encontradas em águas enriquecidas, representada por *Oocystis* sp. e *Monoraphidium circinale* (Nygaard) Nygaard, **X₂**, característica do nanoplâncton eutrófico e que inclui nanoflagelados. No caso de Jacarepaguá, *Pyramimonas* cf. *grossii* Parke (Prasinophyceae) revelou-se um bom descritor do período I. O modelo de Reynolds (1997), ainda em construção, não contemplou em nenhum grupo espécies salobras. A inclusão de *P.* cf. *grossii* em **X₂**, aqui proposta, é uma tentativa de resolução do problema, buscando analogia com o proposto por Reynolds (1997). Ainda no período I foram dominantes *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing var. *dimorphus* (Turpin) Kützing, que fazem parte da associação **J** de clorofíceas sem mucilagem, as quais estão associadas a ambientes rasos e enriquecidos. Reynolds (1997) enfatiza que é comum a ocorrência de **X₁** e **X₂** com a associação **J**. As associações do período destacaram, em geral, uma estratégia de rápido crescimento, eficiente absorção de nutrientes, incrementada pelo pequeno tamanho da maioria dos descritores (nanoplâncton) e crescimento em alta intensidade luminosa. Associação **X₁** já foi identificada e associada às mesmas condições em outra lagoa fluminense (Huszar *et al.*, 2000).

No segundo período, de maior redução dos nutrientes dissolvidos, a associação **J** esteve representada apenas por *Scenedesmus quadricauda* e a associação **Y** (apenas no ponto 1), característico de águas enriquecidas, independentemente de ausência ou não de turbulência, com baixo requerimento por luz, que foi representada por *Cryptomonas erosa* Ehrenberg. Esse período é o do surgimento da associação de *Microcystis aeruginosa* Kützing, **M** formadora de florações em ambientes bem mesclados, rasos de baixa latitudes, com tolerância a baixa intensidade luminosa. Huszar *et al.* (2000) ressaltaram o fato das grandes colônias de *M. aeruginosa* assumirem uma forma achatada e não arredondada. O mesmo verificou-se na Lagoa de Jacarepaguá, confirmando a estratégia de melhor antena de luz da qual esses organismos podem lançar mão, por aumentar sua razão superfície/volume (S/V).

Tabela 4 – Percentagem das associações de espécies do fitoplâncton (Ass.), a partir do grupo de espécies dominantes por período em cada estação de coleta. As associações estão de acordo com Reynolds (1997).

	Período I 21/08 a 11/12	Ass.	Período II 23/12 a 30/04	Ass.	Período III 15/05 a 11/09	Ass.
	13% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	36% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M	80% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M
	14% <i>S. obliquus</i> var. <i>dimorphus</i>	J	15% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	11% <i>Aphanizomenon</i> sp.	S _n
Ponto 1	11% <i>Oocystis</i> sp.	X ₁	11% <i>Cryptomonas erosa</i>	X ₂		
	8% <i>Monoraphidium circinale</i>	X ₁	8% <i>Cyclotella</i> sp.	D		
	10% <i>Pyramimonas</i> cf. <i>grossii</i>	X ₂				
	10% <i>Cyclotella</i> sp.	D				
	5% <i>Crucigenia</i> sp.	J				
	15% <i>S. obliquus</i> var. <i>dimorphus</i>	J	57% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M	79% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M
Ponto 2	6% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	14% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	14% <i>Aphanizomenon</i> sp.	S _n
	8% <i>Pyramimonas</i> cf. <i>grossii</i>	X ₂				
	23% <i>Cyclotella</i> sp.	D				
	7% <i>Cyclotella</i> sp. 1	D				
	13% <i>S. obliquus</i> var. <i>dimorphus</i>	J	45% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M	72% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M
Ponto 3	6% <i>Chlorella minutissima</i>	J	16% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	9% <i>Aphanizomenon</i> sp.	S _n
	5% <i>Scenedesmus quadricauda</i>	J				
	11% <i>Pyramimonas</i> cf. <i>grossii</i>	X ₂				
	18% <i>Cyclotella</i> sp.	D				
	9% <i>Monoraphidium</i> cf. <i>circinale</i>	X ₁				

No Período III, foi amplo o domínio de *Microcystis aeruginosa*, associação **M**, mas também surgiu *Aphanizomenon* sp., incorporado na associação **Sn**, seguindo o proposto por Padisák & Reynolds (1998), uma vez que mais de 90% dos indivíduos não apresentava heterocito, demonstrando uma estratégia de melhor antena de luz do que fixador de nitrogênio molecular. Cabe considerar a importância da forma na adaptação a baixa luz (Reynolds, 1997). Kirk (1983) demonstrou matematicamente que a adaptação morfológica traz mais eficiência para a absorção de luz do que o aumento da concentração intracelular de pigmento uma vez que a interceptação da luz é primeiramente função da geometria e orientação da célula.

As duas últimas semanas de amostragens revelaram um pequeno aumento de heterocito nos indivíduos de *Aphanizomenon* sp. (15-20%), coincidindo com a depleção de amônia. Considerando que a presença de nitrogênio dissolvido no meio inibe a fixação de N_2 (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993), sua diminuição provavelmente foi o fator que estimulou a expressão do heterocito.

Em síntese, a alternância da oferta de NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de nitrogênio, a transparência da água, a temperatura e a salinidade foram os principais fatores associados à substituição de clorococales por cianobactérias e à alta dominância de cianobactérias no ambiente estudado. O sucesso de clorococales foi associado à sua estratégia de crescimento, que se caracteriza pelo curto tempo de geração em relação a outros grupos como cianobactérias (Happey-Wood, 1988).

Fatores também importantes para a seleção das espécies presentes em Jacarepaguá como um todo podem estar relacionados à concentração de CO_2 livre.

A biomassa de clorococales e de diatomáceas, em geral, estiveram se opondo a de cianobactérias, indicando diferentes estratégias de sobrevivência que estão em competição, favorecendo ora um, ora outro grupo para a dominância na Lagoa de Jacarepaguá.

II - Produção de Microcistinas durante uma Floração de *M. aeruginosa* numa Lagoa Costeira Tropical Oligohalina (Lagoa de Jacarepaguá -RJ, Brasil)

A constatação da ampla dominância de cianobactérias e, mais especificamente, de *M. aeruginosa* na Lagoa de Jacarepaguá incentivou a investigação da toxicidade dessas florações no tempo e no espaço. Neste estudo foram consideradas somente duas estações de coleta: Estação Rio Marinho e Estação Arroio Pavuna.

Com o declínio de clorofíceas, a comunidade fitoplanctônica passou a ser dominada pelas cianobactérias, cujo grande crescimento de *M. aeruginosa* (Fig. 11) e *Aphanizomenon* sp. (Fig. 12) foi responsável pelos máximos de biomassa observados. As cianobactérias presentes na Estação Rio Marinho e na Estação Arroio Pavuna no período de floração foram: *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon* sp., *Leptolyngbya* sp. e muito raramente *Raphidiopsis* sp. As biomassas destes dois últimos foram em média duas ordens de grandeza menores do que a de *M. aeruginosa*. Entretanto, estudos posteriores nos mesmos pontos de coleta, demonstraram constância dessas espécies, sempre em baixa concentração (Domingos, dados não publicados).

As biomassas de *M. aeruginosa* e *Aphanizomenon* sp. foram máximas no ponto de maior influência dos despejos antrópicos (estação Arroio Pavuna) (Figs. 11 e 12), indicando um gradiente trófico, que também foi demonstrado pela concentração de microcistina (Fig. 14). A literatura tem registrado florações de *M. aeruginosa* relacionadas a altos níveis de poluição orgânica (Branco e Senna, 1994; Chorus e Bartram, 1999).

M. aeruginosa esteve relacionada a baixas concentrações de NO_3^- ($r = -0,29$) e alta de NH_4^+ ($r = 0,41$) na estação Rio Marinho (Tab. 5). Esses resultados foram observados em relação às cianobactérias como um todo e são coincidentes com os obtidos para *M. aeruginosa*, em virtude da grande contribuição dessa espécie para a biomassa das cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá no período estudado.

Sucesso de *Microcystis* relacionado a amônia foi anteriormente constatado por Blomqvist *et al.* (1994) que, através de experimentos e observações de ambientes naturais, registraram crescimento de *Microcystis* estimulado por amônia, mas não por nitrato. O sucesso de *Microcystis* associado a alto suprimento de amônia é citado por outros autores (Chorus e Bartram, 1999). Barica *et al.* (1980) constataram que adições de N suprimiram a espécie fixadora de N_2 *Aphanizomenon flos-aquae*, estimulando a espécie não fixadora *M.*

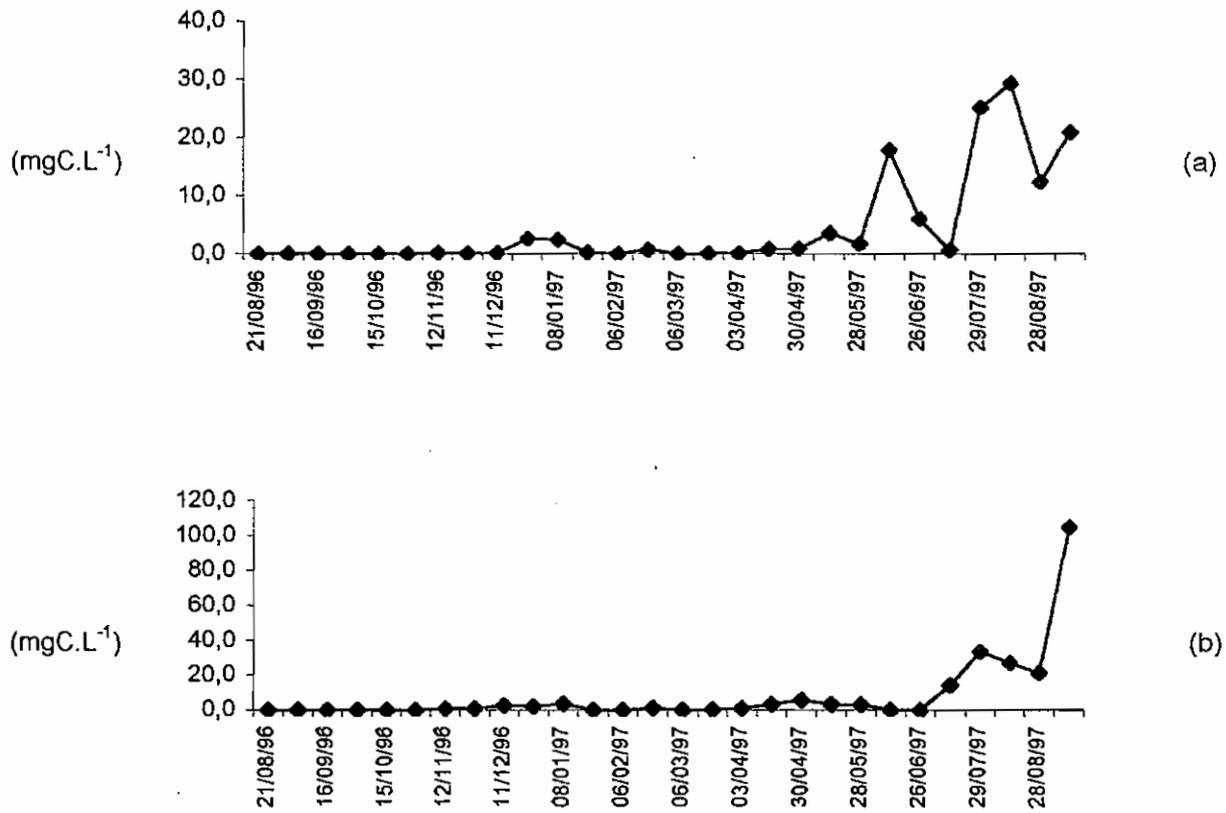


Figura 11 - Variação da biomassa de *Microcystis aeruginosa* (mgC.L⁻¹) nas duas estações de coleta: (a) Rio Marinho e (b) Arroio Pavuna, durante o período estudado.

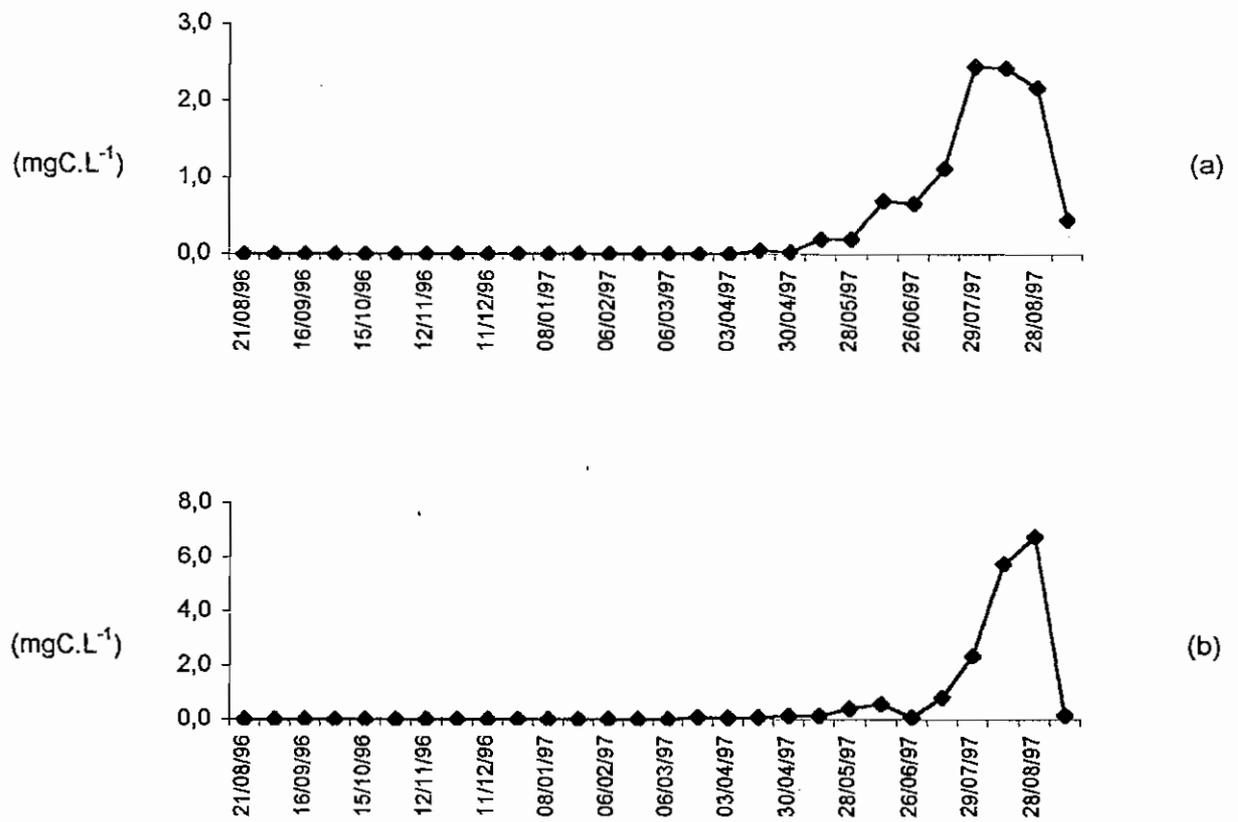


Figura 12 - Variação da biomassa de *Aphanizomenon* sp. (mg C.L⁻¹) nas duas estações de coleta: (a) Rio Marinho e (b) Arroio Pavuna, durante o período estudado.

aeruginosa. Embora os valores de amônia e de nitrogênio inorgânico dissolvido total tenham sido mais elevados na estação Arroio Pavuna, não foram constatadas as relações com esses nutrientes observadas na estação Rio Marinho, indicando a existência de uma heterogeneidade horizontal no ambiente quanto às variáveis determinantes para a composição e biomassa do fitoplâncton.

O maior crescimento de *M. aeruginosa* foi diretamente associado à salinidade, como demonstrado pela correlação positiva verificada no Rio Marinho ($r = 0,58$) (Tab. 5) e no Arroio Pavuna ($r = 0,38$), (Tab. 6). Entretanto, esse resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que não foi observado efeito direto de benefício da salinidade para o crescimento de *M. aeruginosa*, como foi constatado pelos experimentos realizados em laboratório.

A ocorrência e o sucesso de *M. aeruginosa* em ambientes salobros não têm sido reportados com frequência na literatura (Sellner, 1997; Codd, 2000, Sivonen, 1990). Os estudos existentes apontam para uma limitação do crescimento de *M. aeruginosa* em condições de salinidade acima de 5S (Paerl *et al.*, 1984; Yunes *et al.*, 1998).

No Brasil, registros comprovados da ocorrência de cianobactérias tóxicas em lagoas costeiras ainda são bastante restritos, tendo sido citados para a Lagoa da Barra, Maricá-RJ (Azevedo e Carmouze, 1994), Lagoa de Jacarepaguá, RJ (Molica, 1996) e Lagoa dos Patos, RS (Yunes *et al.*, 2000), mas já demonstram a necessidade de uma nova abordagem no país para os problemas de ocorrência de cianotoxinas em corpos de água.

Sellner (1997) enfatizou que os eventos de florações de cianobactérias em águas marinhas e salobras estão limitados a poucos táxons: *Trichodesmium*, *Richelia*, *Nodularia* e *Aphanizomenon*. Em sua revisão esse autor ressalta que espécies comuns como *Microcystis* não precisam ser consideradas quando se trata de florações em ambientes salobros ou marinhos. Paerl (1996) constatou que a salinidade de poucas partes por mil pode ser uma barreira efetiva para a persistência de muitas espécies tóxicas que podem, com a mudança do meio continental para o meio marinho, ser incapazes de compensar o estresse osmótico do aumento de salinidade.

Entretanto, apesar de a salinidade de poucas partes por mil ser considerada uma barreira efetiva para a persistência de muitas espécies tóxicas (Paerl, 1996), foi registrada durante o desenvolvimento deste trabalho não apenas tolerância, como biomassa máxima de *M. aeruginosa* em salinidade de 10S na Lagoa de Jacarepaguá.

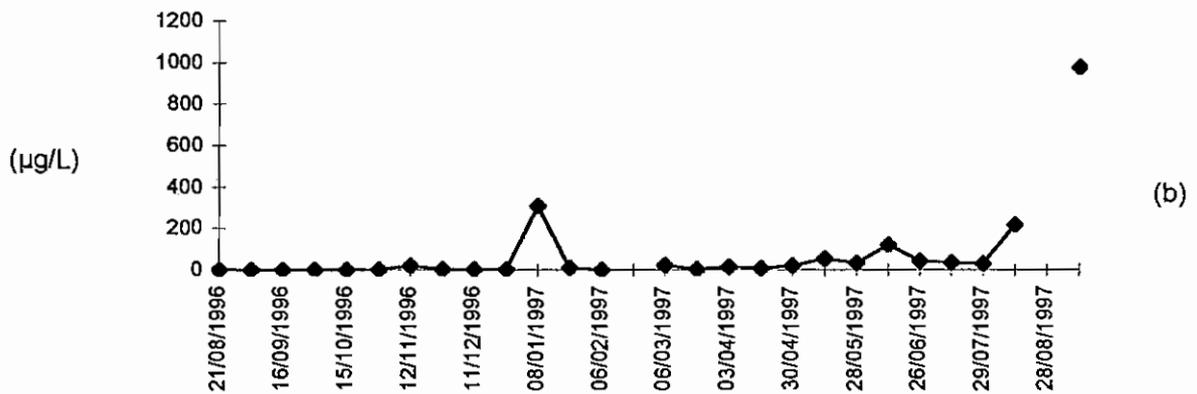
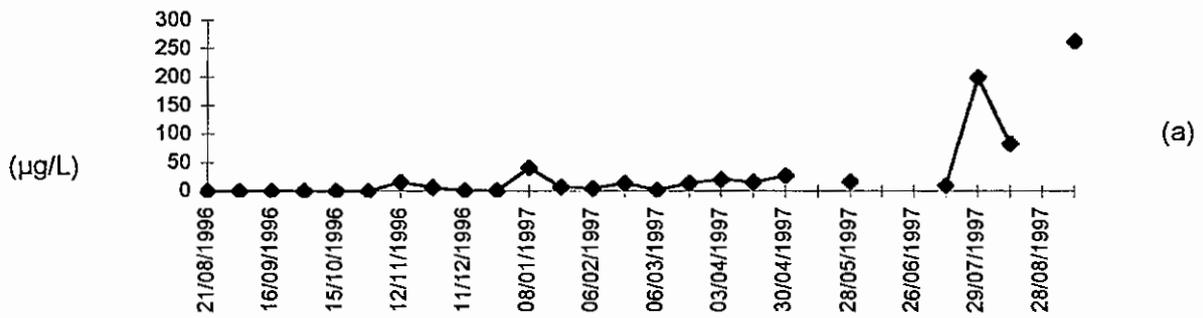


Figura 13 - Variação da concentração de microcistina no séston ($\mu\text{g/L}$) nas duas estações de coleta: (a) Rio Marinho e (b) Arroio Pavuna, ao longo do período estudado.

Tab. 5 - Coeficiente de correlação (r) entre biomassa (mg de C.L⁻¹) de *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon* sp., *Leptolyngbya* sp., concentração de microcistina (µg/L) e quota celular de microcistina em *Microcystis aeruginosa* (pg MC/célula) e algumas variáveis ambientais na estação 1 – Rio Marinho. Somente os resultados significantes ($p < 0,05$) estão mostrados.

	Salinidade	D.S.	Clorofila a	Temperatura	O.D.	Nitrato	Amônia	MC	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ³⁻
<i>M.aeruginosa</i>	0,58	-0,38	0,40	-0,30		-0,29	0,41	0,83	-0,31	0,30
<i>Aphanizomenon</i>	0,65	-0,45					0,48	0,58		0,29
<i>Leptolyngbya</i>		0,47	-0,29	0,38					0,54	
Quota celular		0,47		0,37	0,40				0,46	
Microcistina	0,41				-0,44					

Tab. 6 - Coeficiente de correlação (r) entre biomassa (mg de C. L⁻¹) de *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon* sp., *Leptolyngbya* sp., concentração de microcistina (µg/L) e quota celular de microcistina em *Microcystis aeruginosa* (pg MC/célula) e algumas variáveis ambientais na estação 3 – Arroio Pavuna. Somente os resultados significantes ($p < 0,05$) estão mostrados.

	Profundidade	Salinidade	D.S.	Temperatura	O.D.	Amônia	MC	Zeu/Zmax	NID/PO ₄ ³⁻
<i>M.aeruginosa</i>		0,38	-0,39				0,89	-0,38	
<i>Aphanizomenon</i>		0,48			0,42				
<i>Leptolyngbya</i>			0,29	0,29					
Quota celular	0,38			-0,31		0,55			0,38
Microcistina		0,29	-0,49						

Tab. 7 - Coeficiente de correlação (r) entre biomassa (mg de C. L⁻¹) de *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon* sp., *Leptolyngbya* sp., *Raphidiopsis* sp., concentração de microcistina (µg/L) e quota celular de microcistina em *Microcystis aeruginosa* (pg MC/célula) e algumas variáveis ambientais em todos os locais de amostragem.

Somente os resultados significantes ($p < 0,05$) estão mostrados.

	Salinidade	D.S.	Clorofila a	O.D.	Amônia	MC	Zeu/Zmax	NID/PO ₄	NID
<i>M.aeruginosa</i>	0,39	-0,27				0,57			
<i>Aphanizomenon</i>	0,50	-0,27		0,38					
<i>Leptolyngbya</i>			0,24				0,32		
<i>Raphidiopsis</i>			0,42				0,28		
Quota celular					0,28			0,27	0,24
Microcistina	0,28	-0,26							

Resultados obtidos em nossos estudos de laboratório demonstraram, entretanto, não apenas a adaptação de *M. aeruginosa* à salinidade, pelo menos até 10 S, como também seu crescimento, não apenas em uma cepa, mas em todas as cepas testadas quanto a esse fator, isoladas da Lagoa de Jacarepaguá (Tab. 8).

A temperatura revelou fraca correlação inversa com a biomassa de *M. aeruginosa* ($r = -0,30$) na estação Rio Marinho (Tab 5). A elevação de temperatura tem sido associada ao crescimento de cianobactéria e particularmente de *M. aeruginosa* (Reynolds, 1987). Esse autor demonstrou que *M. aeruginosa* cresce muito lentamente (0,1/d) em temperaturas de 13 a 15° C e que a taxa acelera rapidamente até alcançar 20° C e depois mais lentamente até o máximo entre 27° e 37° C. Entretanto, a maioria desses trabalhos referem-se a ambientes temperados, ou foram realizados com cepas adaptadas previamente a essas condições, o que prejudica a comparação de resultados de ambientes tropicais.

Cabe considerar que o menor valor de temperatura do presente estudo (20° C), de fato coincidiu com uma diminuição de biomassa das cianobactérias, como já demonstrado anteriormente. Os meses de outono e inverno foram os de maior desenvolvimento de *M. aeruginosa* no ambiente estudado, no entanto, a influência de outras variáveis deve ser considerada também nessa resposta.

A correlação negativa entre *M. aeruginosa* e transparência da água (d.S.) ($r = -0,38$ e $r = -0,39$ na estação Rio Marinho e Arroio Pavuna, respectivamente, Tabs. 5 e 6) concorda com resultados observados em outros estudos (Reynolds, 1987; Jensen *et al.*, 1994), embora os ambientes sejam bastante diferentes quanto à profundidade e padrão sazonal. Ambientes tropicais apresentam alto período de insolação durante quase o ano todo. É provável que na Lagoa de Jacarepaguá, em virtude da pouca profundidade, a luz seja um fator que possa selecionar muito mais pelo excesso, principalmente para os indivíduos que estejam localizados na superfície, do que pela escassez. Na verdade, a penetração da luz atinge toda a coluna d' água na maior parte do tempo, como observado através das medidas da transparência da água (d.S.) (Fig. 14). Zohary & Robarts (1989), trabalhando em lago hipereutrófico da África do Sul, concluíram que os fatores principais para a dominância de *M. aeruginosa* foram a baixa turbulência e adaptação à alta incidência luminosa do ambiente.

Na realidade, em ambientes temperados, o padrão sazonal de sucessão das espécies fitoplanctônicas caracteriza-se por florações de cianobactérias no final do verão, enquanto

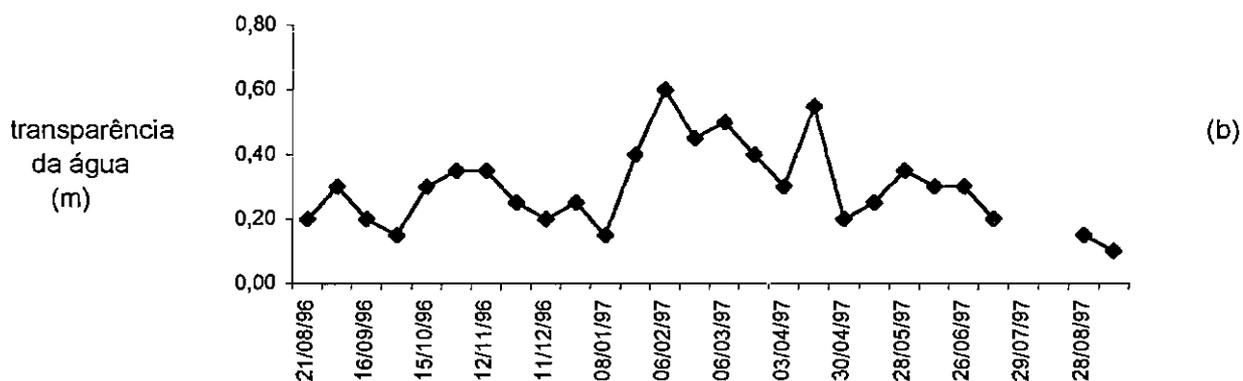
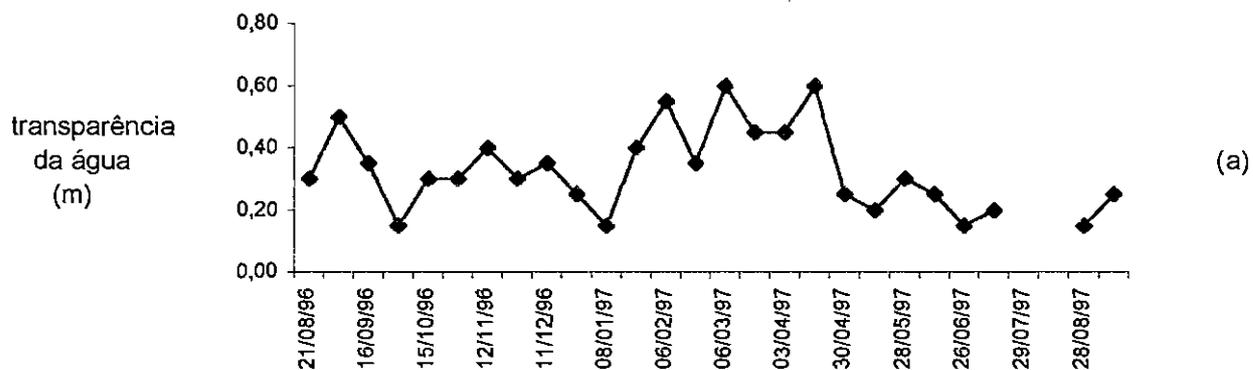


Figura 14 - Variação da transparência da água (disco de Secchi - m) na Lagoa de Jacarepaguá nas duas estações de coleta: (a) Rio Marinho; (b) Arroio Pavuna

que nos trópicos as diferenças sazonais nos fatores ambientais em geral não são grandes o suficiente para induzirem ao deslocamento de cianobactérias por outras espécies, estando muito mais sujeitos à eventos externos e abruptos no controle de sucessão. Assim, a presença ou dominância de cianobactérias verifica-se na maior parte do ano (Carmichael, 1996), fazendo com que os problemas associados com alta biomassa de cianobactérias e os potenciais riscos para o ambiente e a saúde humana com cianotoxinas aumentem.

Na Lagoa de Jacarepaguá foi constatada persistência da dominância de *M. aeruginosa* e da produção de microcistina durante os anos de 1998 e 1999 (Domingos, dados não publ.), inclusive com aumento de biomassa e da concentração de microcistina.

A biomassa de *M. aeruginosa* e a concentração de microcistina na estação Arroio Pavuna foram em média o dobro do observado na estação Rio Marinho (Fig. 11 e Fig. 13), sendo a maior diferença principalmente ao final do estudo, com o aumento de biomassa que foi observado somente na estação Arroio Pavuna. Esta estação recebe maior impacto de rejeitos domésticos em relação à outra estação de coleta, tendo geralmente valores mais elevados de nutrientes.

Todas as amostras analisadas a partir do primeiro registro da ocorrência de *M. aeruginosa* na Lagoa de Jacarepaguá em dezembro de 1996 demonstraram resultados positivos para a presença de microcistinas no fitoplâncton, sendo o máximo observado no período final do estudo e na estação Arroio Pavuna (Fig. 13).

Não há registro na literatura para a produção de microcistinas por *Aphanizomenon*, mas há para *Planktothrix* (Chorus e Bartram, 1999). Considerando-se a possibilidade de *Aphanizomenon* sem heterocito ser identificado como *Planktothrix*, realizou-se uma análise de correlação entre a biomassa de *Aphanizomenon* e a concentração de microcistina do fitoplâncton. A correlação positiva observada na estação Rio Marinho ($r=0,58$) (Tab. 5), não se confirmou na estação Arroio Pavuna (Tab. 6). O valor positivo da correlação pode indicar apenas a flutuação da abundância desse gênero que em geral acompanhou a de *M. aeruginosa*. Além disso, a biomassa de *Aphanizomenon* representou, em média, de 10 a 15 % da de *M. aeruginosa* e seu desenvolvimento só se deu a partir de março de 97.

As tentativas de isolamento e cultivo em laboratório de *Aphanizomenon* não tiveram sucesso o que inviabilizou a investigação sobre o potencial tóxico desse gênero para o ambiente estudado.

Cabe considerar, entretanto, que apesar de Sellner (1997) concluir que *Aphanizomenon flos-aquae* não produz toxinas em ambientes salobros, esses organismos

podem liberar várias substâncias no ambiente, alterando a composição do plâncton, inibindo o crescimento de espécies como *Chlorella*, reduzindo a abundância de bactérias e da comunidade microheterotrófica e da população de zooplâncton e reduzindo a herbivoria planctônica (Sellner, 1997).

As cepas de *Leptolyngbya* testadas não se mostraram tóxicas nos bioensaios, nem produtoras de microcistinas, quando analisadas por HPLC. Assim, a presença de microcistinas na Lagoa de Jacarepaguá teve como causa principal, se não única, o sucesso de *M. aeruginosa* nesse ambiente.

M. aeruginosa foi considerada a principal responsável pela produção de microcistinas na Lagoa de Jacarepaguá, não apenas pela alta biomassa desenvolvida, como também pelos resultados a partir de bioensaios e análise de HPLC, que revelaram produção de hepatotóxina para todas as seis cepas testadas (Tab. 8).

Destaca-se a alta correlação entre *M. aeruginosa* e microcistina ($r=0,89$ na estação Arroio Pavuna e $r=0,83$ na estação Rio Marinho) (Tabs. 5 e 6). Kotak *et. al* (1995) também observaram alta correlação positiva entre a concentração de microcistina e *M. aeruginosa* em lagos hipereutróficos do Canadá.

A correlação inversa observada entre a transparência da água (disco de Secchi) e *M. aeruginosa* ($r=0,31$ na estação Rio Marinho e $r=0,38$ na estação Arroio Pavuna) (Tab. 5 e Tab. 6), provavelmente reflete a diminuição da penetração da luz na coluna d'água em consequência do aumento de biomassa ou mesmo o auto-sombreamento que *M. aeruginosa* pode causar devido a sua capacidade de flutuação.

Não foi detectada presença de microcistina dissolvida na água em nenhuma das amostras analisadas por HPLC. Sabe-se que microcistinas são endotoxinas e que não são liberadas em níveis significativos para a água sem lise celular (Carmichael e Gorham, 1981). Em ocasiões de diminuição da biomassa de cianobactérias no ambiente, pressupondo decomposição e lise celular (22/02/97, 28/02/97 e 06/03/97), as amostragens foram intensificadas para uma frequência semanal, mas os resultados continuaram negativos.

Watanabe *et al.* (1992), após encontrarem indícios de liberação na água de microcistina (1,1 $\mu\text{g/L}$) causada pela decomposição celular, afirmaram que a detecção de microcistina na água pode ser pequena devido a fatores como dispersão ou decomposição.

Tabela 8 - Cepas de *Microcystis aeruginosa* isoladas da Lagoa de Jacarepaguá que foram testadas quanto ao crescimento em salinidade 10S e quanto à toxicidade.

Cepas	Táxon	Teste	Resultado	Crescimento *** em salinidade 10S
NPLJ- 30	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HPLC	Positivo*	○
NPLJ- 31	<i>Microcystis aeruginosa</i>			●
NPLJ- 32	<i>Microcystis aeruginosa</i>			○
NPLJ- 33	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HPLC	Positivo	
NPLJ- 37	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaio /HPLC	Positivo**	○
NPLJ- 39	<i>Microcystis aeruginosa</i>			○
NPLJ- 40	<i>Microcystis aeruginosa</i>			●
NPLJ- 41	<i>Microcystis aeruginosa</i>			○
NPLJ- 42	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HPLC	Positivo	
NPLJ- 43	<i>Microcystis aeruginosa</i>			○
NPLJ- 44	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HPLC	Positivo	
NPLJ- 46	<i>Microcystis aeruginosa</i>			●
NPLJ- 47	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bioensaio /HPLC	Positivo	●

* Os resultados positivos em HPLC indicam a ocorrência de pelo menos um pico com espectro de absorção no ultravioleta equivalente ao espectro de Microcistina-LR padrão.

** Os resultados positivos em bioensaio indicam a morte dos animais testados com sintomas compatíveis a hepatotoxicose aguda.

***As condições de crescimento referem-se ao cultivo em meio ASM-1, acrescido da concentração de NaCl adequada. (○) indica pouco crescimento; (●) indica maior crescimento.

Apesar da molécula de microcistina ser altamente estável quimicamente e resistente à hidrólise química ou oxidação em pH neutro, alguns fatores encontrados no ambiente podem degradá-la ou removê-la da coluna d'água por adsorção.

Remoção da molécula dissolvida na água pode acontecer por adsorção em minerais de argila numa eficiência de 81% (Morris *et al.*, 2000), por degradação bacteriana (Cousins *et al.*, 1996), por fotólise pela luz solar (Welker e Steinberg, 1999), sendo mais eficiente a luz UV, que degrada em minutos microcistinas LR e RR (Dawson, 1998).

Considerando que a estabilidade desse heptapeptídeo cíclico pode garantir sua persistência na coluna d'água por até 15 dias em estado particulado e por até 30 dias em estado dissolvido (Lahti *et al.*, 1997), a não detecção de microcistinas na água após diminuição da biomassa de *M. aeruginosa*, poderia estar associada a um desses fatores, principalmente a decomposição por fotólise, considerando a alta insolação das regiões tropicais, sobretudo nos meses de verão e a decomposição bacteriana, favorecida pelas elevadas temperaturas.

A produção de microcistinas por unidade celular de *M. aeruginosa* (quota celular) foi calculada, e demonstrou uma flutuação no tempo e no espaço (Fig. 15).

Adotou-se a apresentação dos dados em termos de quota celular, apesar do número de células ter sido estimado de maneira indireta, (cálculo do biovolume das colônias) e de ter-se assumido que *M. aeruginosa* foi a única fonte de produção de microcistinas. Consideramos que essa unidade seja mais representativa da toxicidade do que a produção por peso seco, mais utilizada, uma vez que a limitação de um fator particular para o crescimento e para a taxa específica de divisão celular pode provocar mudanças na massa celular e conseqüentemente no conteúdo de carboidratos e proteínas (Fogg e Thake, 1987). Por esses motivos, recentemente, alguns autores têm optado pelo uso da quota celular como unidade que melhor expressa a variação da toxidez em microalgas (Orr e Jones, 1998).

A quota celular demonstrou alta variação no ciclo anual, com os valores máximos sempre registrados em fases de diminuição da biomassa de *M. aeruginosa*, sugerindo a possibilidade desta ter sido subestimada nas ocasiões em que pequenas colônias dominavam. Para estimar o volume celular, e indiretamente o número de células, procedeu-se à realização de medidas de comprimento (C), largura (L) e espessura (E) das colônias. A espessura foi a medida com maior dificuldade para ser obtida, principalmente nas grandes colônias, em função de sua forma muito achatada. Assim, estabeleceu-se uma média para

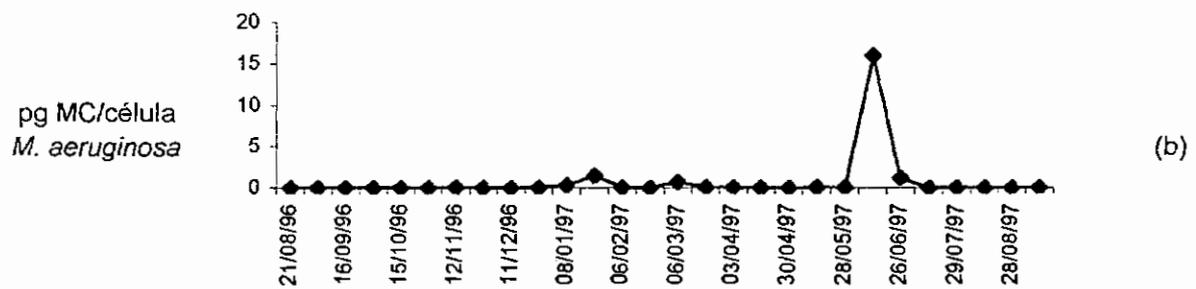
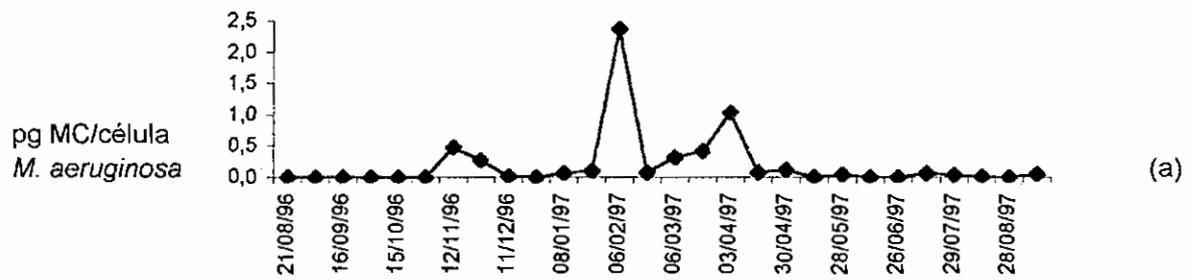


Figura 15 - Variação da quota celular (microcistinas/célula) de *M. aeruginosa* nas duas estações de coleta, durante o período de estudo.

C/E e L/E para as diferentes faixas de tamanho das colônias. É possível que colônias menores, na fase inicial do crescimento, apresentem maior variabilidade na razão C/E e L/E do que colônias maiores.

Outra possibilidade é a que leva em conta que colônias pequenas são provavelmente formadas por indivíduos jovens, que podem estar em fase exponencial de crescimento, onde vários autores comentam que a síntese de microcistina é maximizada (Watanabe *et al.*, 1989).

Um gradiente espacial também foi notado quanto à quota celular de microcistina (Fig. 15). As duas estações tiveram um padrão ao longo do tempo que diferenciou nitidamente os dois locais. Na estação Arroio Pavuna, região mais eutrofizada e portanto mais produtiva, verificaram-se os maiores valores para quota celular de microcistina, da mesma forma que para a concentração de microcistinas no fitoplâncton e para biomassa de *M. aeruginosa*.

As variações ambientais ao longo da lagoa e ao longo do período estudado podem contribuir para explicar a variação da toxicidade da floração. Há interesse crescente em se determinar as condições ambientais que regulam a concentração de microcistina no meio para permitir intervenções mais eficazes de controle da toxicidade de cianobactérias no ambiente.

Dentre as variáveis que poderiam estar influenciando a toxicidade da floração de *M. aeruginosa* na Lagoa de Jacarepaguá, destacaram-se, através da análise de correlação, a transparência e temperatura da água e oxigênio dissolvido (O.D.) na estação Rio Marinho (Tab. 5), a temperatura da água, concentração de amônia e razão NID/PO₄ na estação Arroio Pavuna. Alguns autores afirmam que o conteúdo de microcistina por biomassa ou por célula pode ser significativamente alterado pelas variáveis ambientais.

Resultados de estudos em laboratório demonstraram que a intensidade luminosa, a temperatura, a concentração de nutrientes (principalmente P e N) e o pH/CO₂ são fatores importantes para o controle da produção de cianotoxinas (van der Westhuizen e Eloff, 1983; Runnegar *et al.*, 1983; Van der Westhuizen and Eloff, 1985; Watanabe e Oishi, 1985; Codd e Poon, 1988; Utkilen e Gjølme, 1992).

Os resultados desses estudos em geral apontam para mudanças na concentração de microcistina por unidade de biomassa de *Microcystis* (peso seco) num fator de até cinco vezes.

A concentração de fósforo no meio pode modificar em torno de duas vezes o conteúdo de microcistina por unidade de biomassa de *M. aeruginosa* (Utkilen e Gjølme, 1992), enquanto que o nitrogênio tem sido associado a uma alteração de três a cinco vezes (Codd e Poon, 1988; Utkilen e Gjølme, 1992). Por outro lado, vários estudos em laboratório apontam para a independência de fatores ambientais como concentração de fosfato (Watanabe e Oishi, 1985 e Codd e Poon, 1988) e de nitrogênio (Watanabe e Oishi, 1985) para o conteúdo de microcistina por unidade de *M. aeruginosa*.

Alguns autores afirmam que a temperatura pode modificar a produção de microcistina por unidade de cianobactéria de 1,4 a 4 vezes (Runnegar *et al.*, 1983; Van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe e Oishi, 1985), entretanto os valores de temperatura ótima da maioria desses estudos (entre 18 e 32° C) foram considerados por outros autores sem nenhuma, ou com muito pouca influência sobre a mudança do teor de microcistina por unidade de biomassa de *Microcystis* (Ohtake *et al.*, 1989).

Nestes estudos, fatores como temperatura, concentração de fósforo e de nitrogênio nem sempre demonstraram respostas similares quanto a seu efeito sobre a produção de microcistinas. Essas discordâncias podem significar diferentes respostas de diferentes cepas ao mesmo estímulo externo. Além disso, trabalhos mais recentes têm contestado a estimativa do conteúdo de MC/unidade de *Microcystis* avaliada a partir da biomassa em peso seco, atribuindo a isso a existência de resultados tão discordantes e também ao uso de HPLC e bioensaios com camundongos, técnicas diferenciadas, para estimar a toxicidade (Utkilen e Gjølme, 1992; Orr e Jones, 1998).

Esses autores optaram, respectivamente, por expressar a concentração de microcistinas por unidade de cianobactérias em MC/proteína celular e MC/célula (quota celular).

Na Lagoa de Jacarepaguá, a quota celular no ambiente flutuou espacial e temporalmente em até 30 vezes. Os valores dessa variação foram superiores aos registrados em experimentos de laboratório, cuja variação máxima da concentração MC/peso seco de *M. aeruginosa* está entre quatro a cinco vezes (Chorus e Bartram, 1999).

Orr e Jones (1998), que expressaram a produção em termos de quota celular, concluíram que a variação dessa quota ocorre numa faixa de apenas 2 a 3 vezes, porque para esses autores, a produção de microcistina é um processo completamente acoplado ao crescimento celular, e portanto, as variáveis ambientais não atuam de forma isolada sobre sua produção, mas sim sobre o crescimento do organismo que a produz.

Cabe considerar que experimentos realizados em laboratório, por mais que busquem aproximar-se das condições ambientais, conseguem apenas manipular as variáveis selecionadas que não podem ser representativas da grande interação de fatores e suas diferentes dinâmicas, que ocorrem no meio natural. É possível que a interação e flutuação dos vários fatores do ambiente contribuam para aumentar a faixa de flutuação da quota celular.

Estudos para avaliar a influência de fatores ambientais na produção de microcistina em ambiente natural são escassos (Wicks e Thiel, 1990; Kotak *et al.*, 1995 e Watanabe, 1996; Kotak *et al.*, 2000) e muitas vezes discordantes, mas talvez mais apropriados para uma análise comparativa com os resultados do presente trabalho.

A correlação positiva entre a quota celular de microcistina e O.D. na estação Rio Marinho ($r = 0,40$) (Tab. 5) pode ser interpretada como um ponto em concordância com a hipótese da produção de microcistina estar associada ao metabolismo primário, uma vez que a concentração de oxigênio dissolvido no meio está diretamente envolvida com as atividades de produção e respiração. Essa correlação já havia sido observada em outro ambiente hipereutrófico tropical (Wicks e Thiel, 1990).

A temperatura, que é claramente um importante fator para o metabolismo celular, mostrou-se discordante em termos espaciais na Lagoa de Jacarepaguá quanto à influência para a quota celular. A correlação foi direta na Estação Rio Marinho ($r = 0,37$) e indireta na Estação Arroio Pavuna ($r = -0,31$) (Tabs. 5 e 6).

Apesar de os trabalhos de laboratório encontrarem importante alteração do conteúdo de microcistina/peso seco em função da temperatura, o resultado de Kotak *et al.* (1995) em ambiente natural foi discordante. Esses autores ressaltaram a inexistência de correlação com temperatura, concluindo que esta não é um bom preditor para a concentração de microcistina “in situ”.

Entretanto, esses resultados foram obtidos em lagos do Canadá, onde alguns corpos d'água podem permanecer mais de 6 meses cobertos por gelo (Kotak *et al.*, 2000). Estudo semelhante na África do Sul revelou influência positiva do aumento de temperatura sobre a concentração de microcistina no fitoplâncton (Wicks e Thiel, 1990).

A correlação direta entre a quota celular e amônia ($r = 0,55$) e $\text{NID}/\text{PO}_4^{-3}$ ($r = 0,38$) na estação Arroio Pavuna (Tab. 6) indicam a importância dos nutrientes, particularmente nitrogênio, para a síntese de microcistinas por *M. aeruginosa*. Esses resultados foram opostos aos verificados por Kotak *et al.* (2000), que observaram correlação negativa entre

a biomassa de *M. aeruginosa* e a razão TN/TP no ambiente e que afirmaram ter encontrado resultado semelhante para a quota celular em experimentos. Esses autores concluíram que a dinâmica de MC no fitoplâncton dos lagos estudados foi relacionada a mudanças na concentração de N e P e na razão de N/P.

A análise de correlação revelou diferentes variáveis relacionadas a quota celular para cada ponto de amostragem. Essas diferentes respostas revelam o mosaico espacial que compõe o ambiente natural e mostram a necessidade de considerar-se aspectos situacionais, além dos gerais quando se trata um ambiente como um todo. Uma das possíveis causas para a diferença encontrada entre nossos resultados e os de Kotak *et al.* (2000) pode ser o fato desses autores terem optado por trabalhar com valores das médias de períodos sazonais, eliminando a flutuação dos dados.

Quando reunimos os dados das duas estações de coleta e examinamos as condições ambientais que se relacionaram com a quota celular de microcistina na lagoa, destacam-se as concentrações de nutrientes no meio (Tab. 7). Embora fracamente relacionadas, as condições destacadas foram a alta concentração de amônia e a maior razão NID/PO₄⁻³ ($r = 0,28$ e $0,27$, respectivamente) e NID ($r = 0,24$) (Tabs. 5, 6 e 7). Não houve correlação com fósforo solúvel reativo.

Estudos realizados em ambiente natural são discordantes quanto à importância dos nutrientes para a concentração de microcistina no meio. Enquanto Kotak *et al.* (1995) e Kotak *et al.* (2000) verificaram forte correlação positiva com P e inversa com N e TN/TP em lagos do Canadá, Wicks e Thiel (1990) não acharam correlação forte com concentração de nutrientes orgânicos ou inorgânicos.

O aumento da concentração de nitrogênio inorgânico total (NID), de amônia e da razão NID/PO₄⁻³ influenciou a toxicidade da floração de *M. aeruginosa* na Lagoa de Jacarepaguá. Esses resultados associados às observações de correlação positiva com amônia e com a razão NID/PO₄⁻³ na estação Arroio Pavuna sugerem que as condições que favoreceram o aumento da biomassa de *M. aeruginosa* podem também favorecer o aumento da quota celular e revelam a importância do estado trófico do ambiente em eventos de florações tóxicas de cianobactérias.

Esses resultados podem indicar uma associação entre produção de microcistinas e o desenvolvimento de *M. aeruginosa*, sendo influenciados pelas mesmas variáveis ambientais. Não foi observado nesse ambiente processo de produção de microcistinas

acoplado ao crescimento celular de *M. aeruginosa*, como destacado por alguns autores (Watanabe and Oishi, 1985; Kotak *et al.*, 1995; Orr e Jones, 1998), de acordo com os resultados da análise de correlação, embora seja indicada uma dependência dos dois processos ligados às mesmas variáveis ambientais.

A flutuação da concentração de microcistinas no ambiente pode se dar em função da biomassa e da variação da quota celular. Essa variação se explica pela existência de cepas com diferentes quotas celulares de microcistina, inclusive não produtoras de microcistinas (Chorus e Bartram, 1999). Além disso, a variação pode ainda dar-se porque a quota celular pode mudar em até cinco vezes como resposta a mudanças nas condições ambientais.

Variáveis ambientais são importantíssimas para o conteúdo celular de microcistina ou mesmo sua concentração no ambiente. Primeiramente porque essas variáveis interferem na composição específica da comunidade fitoplancônica e em sua biomassa, selecionam cepas dentro das populações mais bem sucedidas e podem mesmo estimular ou silenciar a atividade de certos genes (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993).

A produção de microcistinas, assim como o estado fisiológico da célula pode ser afetado por alguns fatores ambientais. A importância da luz para os organismos autotróficos, da temperatura para o metabolismo celular, das concentrações externas de recursos nutrientes para a absorção celular coloca em evidência a necessidade de se considerar esses fatores. Todos esses fatores serão determinantes para o risco potencial e quantidade de microcistina presente tanto em corpos d' água para abastecimento humano, quanto para uso recreacional.

A presença de microcistinas na Lagoa de Jacarepaguá oferece um risco real para seus freqüentadores. A principal vocação do ambiente é a pesca e o uso recreacional. A presença de microcistina LR já foi confirmada em vísceras, fígado e nos músculos de peixes da Lagoa de Jacarepaguá (Magalhães *et al.*, 2001), e representa um risco potencial para seus usuários e um grave problema de saúde pública, uma vez que não há controle do comércio e destino dos peixes ali pescados. Além disso, condições de baixa maré, com saída de água da lagoa para o mar, manchas verdes das florações de cianobactérias são observadas no mar, próximo à entrada da lagoa, por mais de 24 h.

Considerando-se que as concentrações recomendáveis pela OMS são de até 20.000 células/ml para águas de uso recreacional e que o rápido, irreversível e severo dano ao fígado causado por microcistinas exige medidas preventivas, pois terapias têm muito pouco

ou nenhum valor, torna-se enfaticamente recomendável medidas mitigadoras das florações de cianobactérias nesse ambiente.

Diante dos fatos acima relatados, a Lagoa de Jacarepaguá deveria estar incluída num amplo programa de monitoramento e de manejo para controlar o desenvolvimento de cianobactérias tóxicas e o uso desse corpo d'água pela população.

III - Crescimento e Produção de Microcistinas por *M. aeruginosa* em Diferentes Condições de Salinidade e em Competição com *E. crassipes* – Macrófita Aquática

A partir das coletas realizadas na Lagoa de Jacarepaguá foi possível isolar-se 20 cepas de cianobactérias, sendo 13 de *M. aeruginosa*. Após testes iniciais de toxicidade e crescimento com as cepas isoladas, selecionou-se a cepa NPLJ-37 para realização dos experimentos a seguir, por estar dentre as mais tóxicas de acordo com as análises por HPLC (Tab. 8). Os experimentos foram realizados variando-se o meio de cultivo, a salinidade e a presença ou ausência de *E. crassipes*, para verificar o crescimento e a toxicidade da cepa selecionada, sob essas condições.

Cultivos realizados com variação de salinidade (Controle; Condição 2S; Condição 5S e Condição 10S), obtidos com a adição de NaCl ao meio ASM-1, permitiram constatar que a salinidade de 10S inibiu fortemente o crescimento de *M. aeruginosa*, não sendo praticamente observado crescimento nessa condição (Fig. 16). A concentração de clorofila a diminuiu continuamente durante o experimento, demonstrando nitidamente a inviabilidade das células nessa condição (Fig. 17).

Resultado semelhante foi observado para outra cianobactéria (*Nostoc muscorum*) que teve seu crescimento celular completamente inibido a 11S de NaCl (Blumwald e Tel-Or, 1982).

O estresse que a condição 10S representou para o desenvolvimento da cepa NPLJ-37 pode ser constatado através da forte inibição ao crescimento celular. Esse comportamento é esperado, uma vez que células sujeitas a choques ou variações ambientais respondem reduzindo sua taxa de crescimento como consequência de modificações profundas no seu metabolismo geral e no seu padrão de expressão gênica (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993).

Na condição 5S, houve limitação do crescimento, evidenciado pela redução de 45% da taxa máxima de crescimento (μ máx.) e do tempo de duplicação (G) em relação ao controle (Tab. 9). O aumento da concentração de clorofila a ao final do cultivo (Fig. 17) pode ter sido efeito de auto-sombreamento, o que indica a viabilidade das células nessa condição, embora com baixo crescimento.

Cabe considerar que foi observada em *Nostoc muscorum* grande tolerância e adaptação do aparato fotossintético ao aumento da salinidade, sugerindo que as mudanças

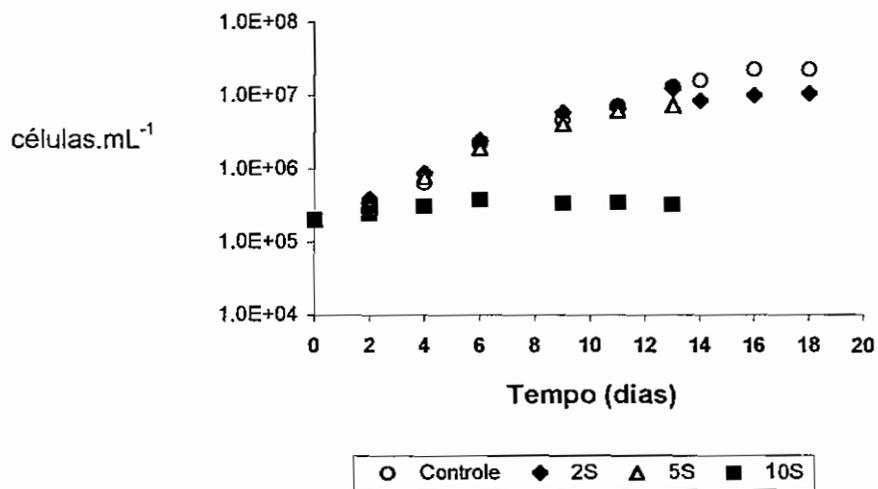


Figura 16 - Curva de crescimento da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade: Controle (A^{*}); 2S (A); 5S (B) e 10S (C), obtidas por adição de NaCl.

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ao nível de significância de 5%.

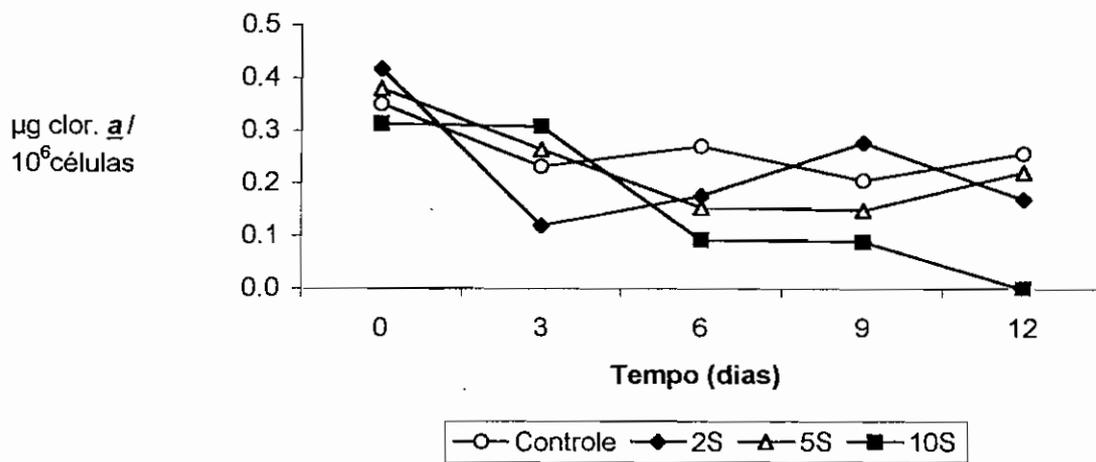


Figura 17 - Variação da concentração de clorofila *a* em células da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade (Controle; 2S; 5S e 10S), obtidas por adição da NaCl.

Tabela 9 – Valores correspondentes à taxa de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx.}}$) e tempo de duplicação (G), da cepa NPLJ-37, cultivada em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade, obtidas por adição de NaCl; cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa e cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa em presença e ausência de aguapé, sob diferentes condições de salinidade (Controle; 2S; 5S e 10S).

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes entre linhas e (•) significa resultados estatisticamente diferentes entre colunas, ao nível de significância de 5%.

	<i>Microcystis aeruginosa</i> (NPLJ-37)			
	Taxa de crescimento (μ)	Tempo de duplicação em dias (G)	ANOVA entre linhas	ANOVA entre experimentos
NaCl – controle	0.40	1.7	A*	
NaCl – (2S)	0.38	1.8	A	
NaCl – (5S)	0.22	3.1	B	(•)
NaCl – (10S)	0.07	9.2	C	(•)
Água lagoa + ASM-1-controle	0.40	1.7	A	
Água lagoa + ASM-1- (2S)	0.38	1.8	A	
Água lagoa + ASM-1- (5S)	0.35	2.0	B	(•)
Água lagoa + ASM-1- (10S)	0.23	3.0	C	(•)
Sem aguapé - controle	0.39	1.7	A	(•)
Sem aguapé - (2S)	0.40	1.7	A	
Sem aguapé - (5S)	0.33	2.1	B	(•)
Sem aguapé - (10S)	0.22	3.1	C	(•)
Com aguapé – controle	0.26	2.7	A	(•)
Com aguapé - (2S)	0.45	1.5	B	
Com aguapé - (5S)	0.55	1.3	C	(•)
Com aguapé - (10S)	0.36	1.9	D	(•)

Tabela 10 – Rendimento máximo (R) do aguapé obtido a partir da variação do peso em gramas para cada condição de cultivo.

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes entre linhas (tratamentos), não houve diferença entre colunas (experimentos), ao nível de significância de 5%.

	com <i>M. aeruginosa</i>		sem <i>M. aeruginosa</i>	
Controle	1,49	A*	1,52	A
2S	1,41	B	1,69	A
5S	0,96	C	1,22	B
10S	0,80	D	1,14	B

estruturais no sistema tilacóide estiveram envolvidas no processo de adaptação das células de *N. muscorum* à maior salinidade (Blumwald e Tel-Or, 1982). Esses autores demonstraram que danos ao sistema tilacóide durante a adaptação ao sal foram restaurados principalmente a partir da síntese de clorofila, enquanto que a síntese das ficobiliproteínas não foi totalmente restaurada.

Experimentos realizados com *Microcystis firma*, variando estudos com choque gradual ou repentino de sal demonstraram, entretanto, forte redução das atividades metabólicas (fotossíntese e respiração), do crescimento e da concentração de clorofila, somente nas culturas submetidas a mudança de salinidade repentina, mas não nas submetidas a mudança gradual (Erdmann *et al.*, 1992).

A curva de crescimento na condição 2S aproximou-se do observado para o controle. A taxa de crescimento e o tempo de duplicação apresentaram nessa condição uma ligeira redução de 5% em relação ao controle (Tab. 9). O aumento da concentração de clorofila \underline{a} nas condições controle e 2S condizem com o esperado para células em bom estado fisiológico durante a fase de crescimento exponencial (Fig. 17).

Poucos são os registros sobre a permanência de *M. aeruginosa* em ambientes de salinidade, sendo o valor de tolerância máxima encontrada na literatura consultada em torno de 5 - 6 S. Estes estudos realizados em ambientes sujeitos a variação de salinidade, com ocorrência de *M. aeruginosa*, mostraram diminuição de biomassa como efeito do aumento da salinidade (Yunes *et al.* 1998; Paerl *et al.* 1984), atribuindo a pequenas mudanças de salinidade (0,2 a 0,5S) a capacidade de eliminar até mesmo uma intensa floração de *M. aeruginosa* (Paerl *et al.*, 1984).

A taxa máxima de crescimento registrada (μ máx. = 0,4) na condição de salinidade zero aproximou-se do já observado em um estudo com a cepa NPLJ-4 oriunda do mesmo ambiente (Molica, 1996). Em geral, espera-se que o crescimento máximo de *M. aeruginosa* seja em torno de 0,6/d para culturas coloniais (Reynolds, 1987), como é o caso da cepa estudada neste trabalho.

A análise de variância e o teste de Tuckey entre as médias de μ máx. para cada condição de crescimento com $p < 0,05$ revelou que o μ máx. da condição controle e da condição 2S não foram diferentes ao nível de significância de 5%, mas que houve diferença entre as demais médias.

A salinidade mostrou-se um fator desfavorável ao crescimento e à viabilidade das

células de *M. aeruginosa*, quando representada apenas pelo aumento da concentração de íons orgânicos, particularmente Na^+ e Cl^- . Tais resultados contradizem o observado nos estudos de campo, que permitiram associar o máximo de biomassa de *M. aeruginosa* ao máximo de salinidade (10S) do período estudado.

A variação da concentração de carboidratos intracelulares (C_{BIN}) (Fig. 18) e extracelulares (C_{BEX}) (Fig. 19) foi considerada como indicativa do estado metabólico das células. No 9º dia de cultivo, observou-se um aumento da concentração de C_{BIN} na condição de crescimento 10S, cuja concentração tornou-se maior do que C_{BEX} . O acúmulo de C_{BIN} é devido à diminuição de síntese protéica, com conseqüente utilização em grande parte do carbono inorgânico fixado para a síntese de carboidratos. A predominância dessa via metabólica indica uma fase de acúmulo de reserva energética celular e também redução do crescimento populacional, característico da fase estacionária de crescimento, na qual se encontravam as células dessa condição experimental.

A resposta adaptativa de cianobactérias e de outras microalgas ao aumento da salinidade se dá principalmente pelo acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular, que substituem íons e são menos tóxicos que esses, mesmo em grande concentração (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993).

Esses solutos são acumulados dentro da célula numa concentração que varia diretamente de acordo com a salinidade externa e são capazes de contrabalançar mais de 20% da pressão osmótica externa (Reed e Stewart, 1988).

Em células pouco tolerantes, principalmente em cepas oriundas de água doce e salobra, os solutos acumulados são dissacarídeos (principalmente sucrose e trealose) (Reed e Stewart, 1988). Essa resposta pode estar associada ao aumento de C_{BIN} demonstrado pelas células da cepa NPLJ-37. Alguns estudos realizados com *Microcystis firma* (Erdmann *et al.*, 1992) e *M. aeruginosa*, (Yunes *et al.*, 1998), demonstraram acumulação de glucosilglicerol durante aclimatação a maior concentração de sal, o que é tipicamente observado em cepas de tolerância intermediária à salinidade (Reed e Stewart, 1988).

Estas cepas, entretanto, podem acumular sucrose como metabólito secundário, quando em baixa salinidade, sendo que a síntese do dissacarídeo é mais rápida que a de glucosil e glicerol (Warr *et al.*, 1987, citado em Reed e Stewart, 1988). Dessa forma, a produção de carboidratos simples torna-se vantajosa em espécies presentes em ambientes

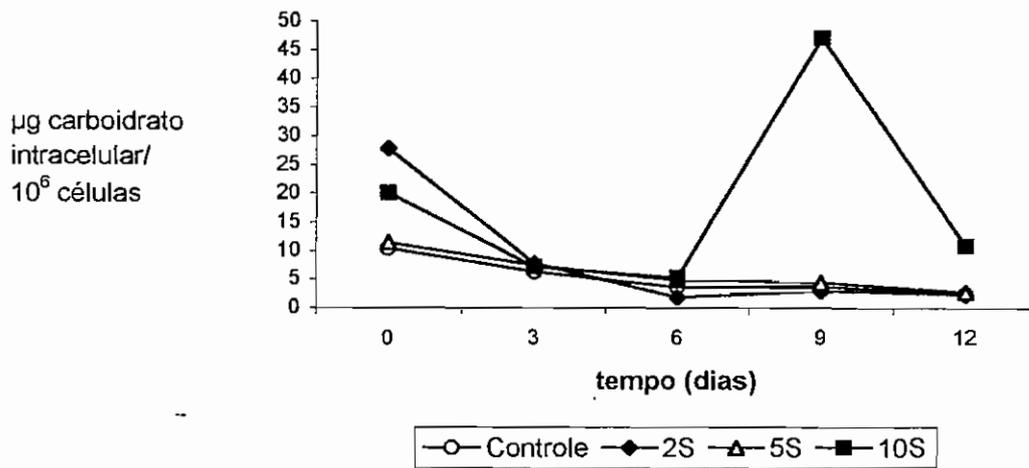


Figura 18 - Variação da concentração de carboidrato intracelular em células da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade (Controle; 2S; 5S e 10S), obtidas por adição de NaCl.

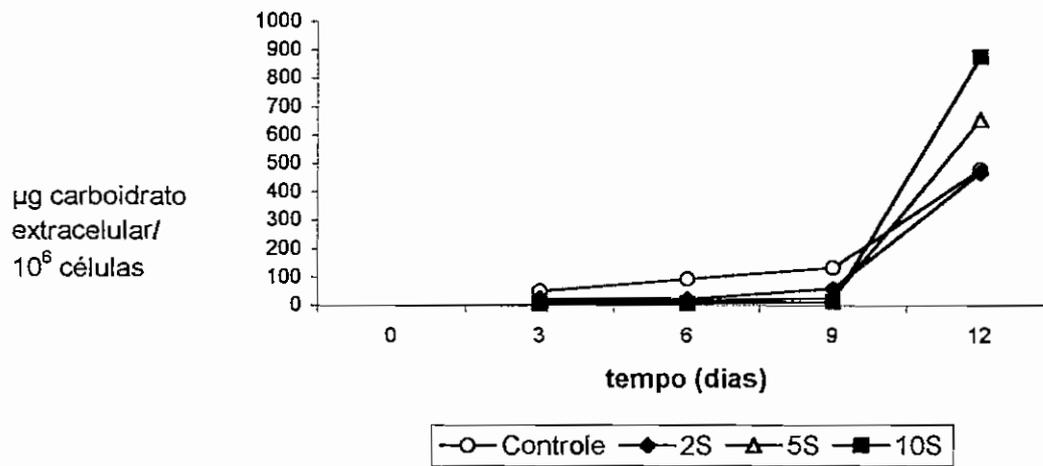


Figura 18 - Variação da concentração de carboidrato extracelular no cultivo da cepa NPLJ-37 em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade (Controle; 2S; 5S e 10S), obtidas por adição de NaCl.

sujeitos a repentinas alterações de salinidade, como estuários e lagoas costeiras, e pode ser uma estratégia importante para o sucesso de *M. aeruginosa* na Lagoa de Jacarepaguá.

O acúmulo máximo de C_{BIN} foi obtido em condição de salinidade 10S, indicando o estresse das células a essa condição de crescimento. Drástico aumento no conteúdo de açúcares também foi observado para *Nostoc muscorum* em presença de NaCl (11S) (Blumwald e Tel-Or, 1982).

Ao final do cultivo, com a exaustão dos nutrientes dissolvidos, o meio de cultura tornou-se limitante para o crescimento celular, causando um estresse nutricional que resultou no aumento do C_{BEX} , cuja concentração foi diretamente relacionada com a salinidade do meio.

Aumento da excreção de carbono orgânico por *M. aeruginosa* já foi observado em situações de aumento de salinidade (num gradiente de 0,5 a 30S), quando se registraram níveis de excreção do C orgânico que representaram em média o dobro do controle (Paerl *et al.*, 1984).

No meio natural, outras moléculas orgânicas e/ou inorgânicas, além do NaCl, podem ser representativas do aumento de salinidade e tornarem-se decisivas para o sucesso de *M. aeruginosa* no ambiente. A fim de investigar essa hipótese, realizou-se um experimento com a mesma variação de salinidade em meio ASM-1 utilizando-se, entretanto, a água da lagoa (Controle - 0S; Condição 2S; Condição 5S e Condição 10S), nas mesmas condições de crescimento.

O crescimento na condição Controle e 2S (Fig. 20) aproximou-se do observado nas mesmas condições do experimento realizado com NaCl, como pôde ser constatado a partir do valor de μ máx. e de G (Tab. 10). A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey demonstraram a existência de médias significativamente diferentes dentre os três tratamentos. O μ máx da condição 2S foi diferente da condição 5S e da condição 10S, enquanto que as médias de μ máx da condição controle e condição 2S foram semelhantes ao nível de significância (α) de 5%.

As condições de crescimento com maior salinidade (5S e 10S), entretanto, revelaram aumento de μ máx. e de G em relação ao experimento com NaCl, evidenciando a importância da composição do meio natural como fator que contribuiu para o sucesso de *M.*

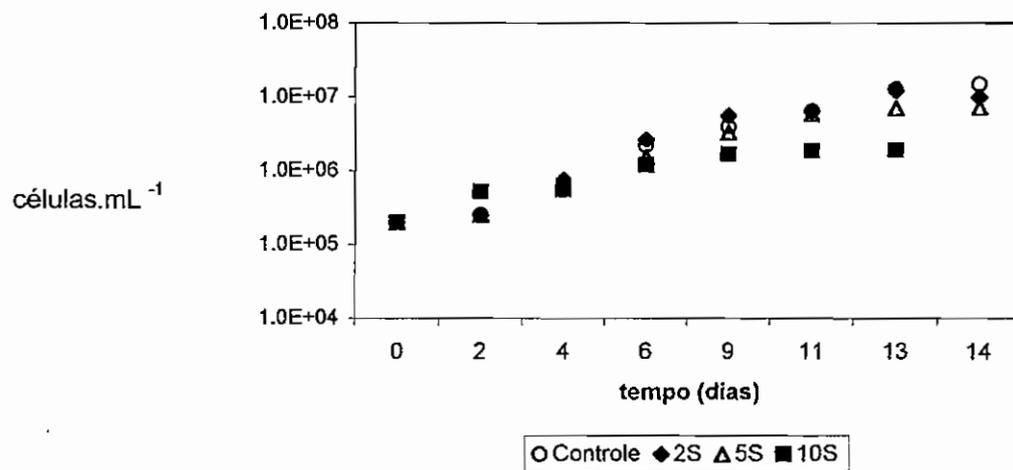


Figura 20 - Curva de crescimento da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa sob diferentes condições de salinidade: Controle (A*); 2S (A); 5S (B) e 10S (C).
 *Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

aeruginosa no ambiente. Cabe considerar que provavelmente o mesmo não aconteceu com o controle nem com a condição 2S em função da diluição que se fez necessária para alcançar a salinidade desejada. A salinidade no meio natural na época da coleta era de 5S. Dessa forma, para o valor de 10S acrescentou-se NaCl e os sais do meio ASM-1, enquanto que para se obter a condição controle e C 2S, foi necessário diluir com água deionizada a água da lagoa que foi utilizada para o preparo do meio de cultivo. Poderia esperar-se, portanto, maior crescimento nessas duas condições, o que não invalida a observação do benefício que o meio natural trouxe sobre o crescimento da cepa NPLJ-37, em comparação ao meio apenas com NaCl.

A ANOVA e o Teste de Tukey entre os dois experimentos (meio com NaCl e meio com água da lagoa) para cada condição de crescimento mostrou que há semelhança entre as médias das condições controle e 2S e que há diferença entre o μ máx. obtido nas condições 5S e 10S ao nível de significância de 5%.

Resultado semelhante já foi constatado por Pearl *et al.* (1984), testando diferentes condições de salinidade em experimentos, usando NaCl ou usando a salinidade do meio natural. No primeiro caso, a inibição do fator estudado (absorção do C inorgânico) foi muito maior com NaCl do que nos mesmos valores de salinidade usando a água do ambiente. Estes autores concluíram que NaCl não foi suficiente para substituir a salinidade da água natural, embora a inibição tenha sido devido ao NaCl, já que sua ausência na mistura artificial eliminou completamente a inibição.

Entretanto, o crescimento de *M. aeruginosa* na condição de maior salinidade permaneceu 41% mais baixo que o das condições controle e 2S, a partir dos valores de μ máx. e de G, evidenciando que esse valor de salinidade foi uma condição desfavorável para o crescimento da cepa NPLJ-37.

Por outro lado, a comparação entre resultados que são observados em laboratório e os que são observados no meio natural tem se mostrado difícil e muitas vezes inviável, em virtude da complexidade que envolve a dinâmica e interação de fatores bióticos e abióticos, cuja resultante é a condição do momento que observamos no ambiente e da qual só apreendemos uma parcela muito reduzida das informações.

Na Lagoa de Jacarepaguá outros fatores, além da salinidade, certamente estariam influenciando a resposta de *M. aeruginosa* no meio natural. Dentre os fatores considerados, destacou-se a drástica diminuição da biomassa da macrófita aquática *Eichhorina crassipes*,

conhecida popularmente como aguapé, jacinto da água ou gigoga, com a elevação da salinidade do meio. Os poucos indivíduos ainda presentes encontravam-se visivelmente desidratados, ou em estado de decomposição.

Essa observação despertou o interesse numa investigação sobre a possível influência dessa comunidade no crescimento de *M. aeruginosa* no meio natural. Cabe destacar que a população de *E. crassipes* sempre foi extremamente abundante na superfície do corpo d' água, e em condições de salinidade até 4 – 5S seus indivíduos mantiveram-se aparentemente saudáveis.

Para a realização desse experimento procedeu-se ao cultivo de *M. aeruginosa* em meio ASM-1 com água da lagoa em ausência e em presença de aguapé nas diferentes condições de salinidade (Controle; Condição 2S; Condição 5S e Condição 10S).

As condições de cultivo nesta etapa não permitiram uma comparação direta com os realizados anteriormente, uma vez que algumas das condições de crescimento foram diferentes. Dessa forma, a comparação entre as variáveis testadas (crescimento e produção de MC por *M. aeruginosa*) foram restritas ao cultivo em meio ASM-1 com água da lagoa em ausência e em presença de aguapé.

O crescimento de *M. aeruginosa* na ausência de aguapé mostrou, de forma semelhante ao observado na etapa anterior, maior crescimento na condição controle e na condição 2S, enquanto que a condição 10S foi a de menor crescimento (Fig. 21). O $\mu_{\text{máx}}$. e o G nas condições controle e 2S aproximaram-se entre si e foram, em média, 15% maiores do que o observado para a condição 5S e, em média, 45% maiores do observado para a condição 10S (Tab. 9).

A ANOVA e o teste de Tuckey revelaram semelhança entre as médias de $\mu_{\text{máx}}$. das condições controle e 2S e diferença entre essas e as condições 5S e 10S, que também foram diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

O crescimento de *M. aeruginosa* em meio ASM-1, com água da Lagoa de Jacarepaguá, em presença de aguapé nas diferentes condições de salinidade (controle – 0S; condição 2S; condição 5S e condição 10S) revelou maior crescimento nas condições com maior salinidade em relação ao controle (Fig. 22). Os valores de $\mu_{\text{máx}}$. e de G na condição controle foram 42%, 53% e 28% menores do que nas condições de salinidade 2S, 5S e 10S, respectivamente.

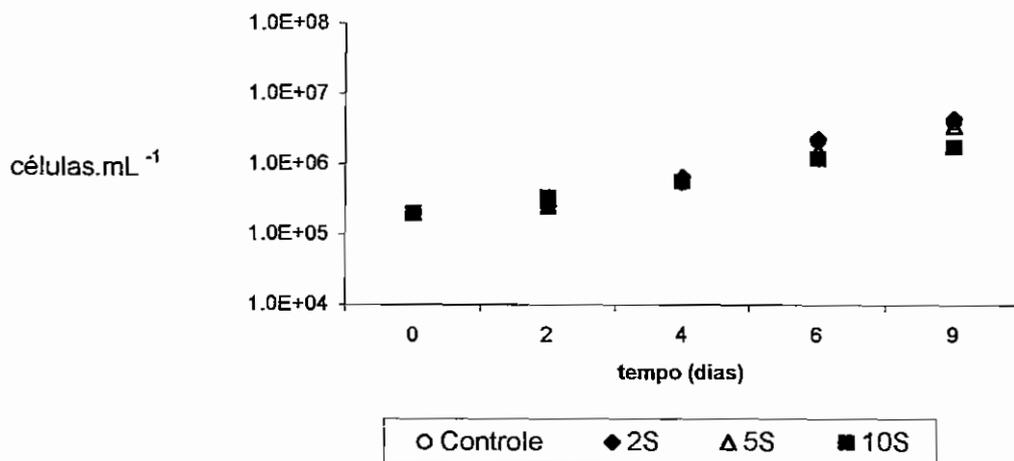


Figura 21 - Curva de crescimento da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa sob diferentes condições de salinidade, em ausência de aguapé - Controle (A*); 2S (A); 5S (B) e 10S (C).

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

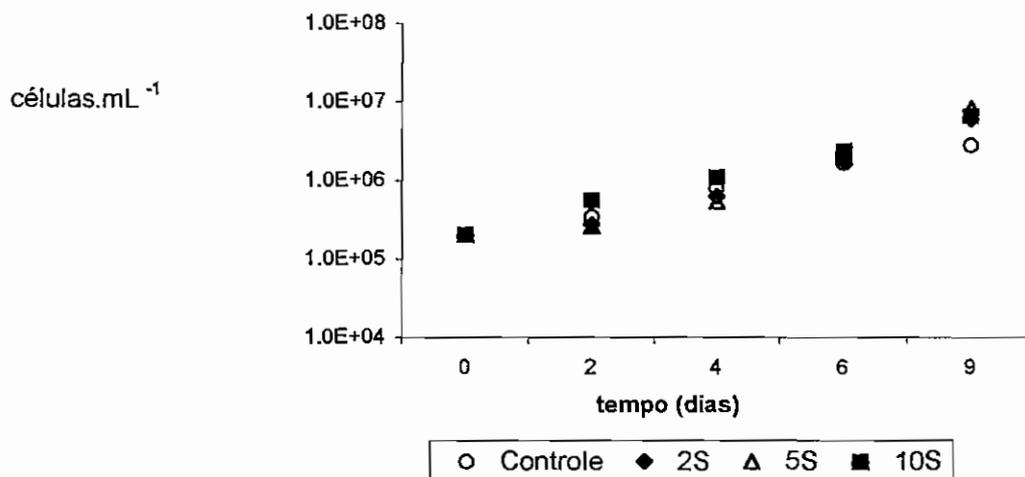


Figura 22 - Curva de crescimento da cepa NPLJ-37 cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa sob diferentes condições de salinidade, em presença de aguapé - Controle (A*); 2S (B); (C) 5S e 10S (D).

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

A ANOVA e o Teste de Tukey mostraram que μ máx. de todas as condições de salinidade foram diferentes entre si, ao nível de significância de 5%.

Os resultados revelaram que o aumento de salinidade na presença de *E. crassipes* foi favorável ao sucesso de *M. aeruginosa*, quando comparados com o crescimento na ausência desta espécie de macrófita.

A média de μ máx. obtidas nos diferentes meios de crescimento (em presença e em ausência de *E. crassipes*) para cada condição de salinidade foi analisada utilizando-se ANOVA e Teste de Tukey, que revelaram nas condições controle, 5S e 10S diferença entre as médias e que somente na condição 2S as médias foram semelhantes ao nível de significância de 5%.

Provavelmente o choque osmótico provocado pelos maiores valores de salinidade para essa macrófita causaram danos irreversíveis aos indivíduos, com perda da água e do turgor celular. Dessa forma, a maior salinidade não apenas eliminou a competição pelos nutrientes do meio, como pode ainda ter trazido uma fonte extra de nutrientes, a partir da decomposição das próprias plântulas, favorecendo duplamente a população de *M. aeruginosa*.

Tais resultados podem significar uma vantagem competitiva de *E. crassipes* sobre *M. aeruginosa* para incorporação dos nutrientes dissolvidos no meio em condições de salinidade mais baixa. Nessas condições, a comunidade funcionaria como importante fator de controle para o desenvolvimento da população de *M. aeruginosa* nesse ambiente.

A eficiência de *E. crassipes* para a absorção de nutrientes dissolvidos é um fator conhecido. Por esse motivo costuma ser usada em planos de manejo para controle de poluição do meio aquático (Petruccio, 1997). Numa lagoa costeira do litoral fluminense, já foi verificada eficiência de até 90% na absorção do aporte de N e P dissolvido por essas macrófitas. Os valores de salinidade acima de 4S, entretanto, resultaram em diminuição da eficiência da absorção pela planta (Petruccio, 1997).

O impacto do aumento da salinidade sobre *E. crassipes* foi testado para investigar o crescimento dessa macrófita nas diferentes condições de cultivo.

Cabe ainda considerar que, embora a condição de crescimento 10S não tenha sido a de maior desenvolvimento de *M. aeruginosa*, pode ocorrer no meio natural um aporte muito maior de nutrientes, proporcionalmente à biomassa de *M. aeruginosa*, do que foi possível investigar em condições experimentais. Ou seja, uma vez que a maior salinidade

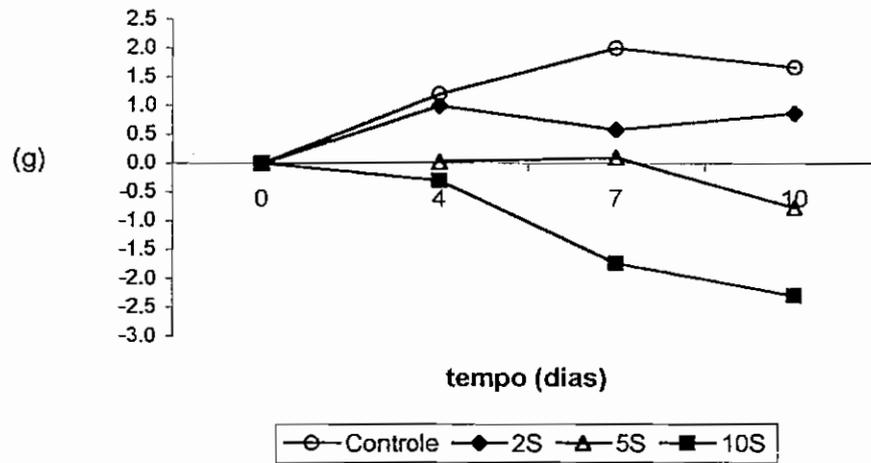


Figura 23 - Variação do peso úmido (g) de *E. crassipes*, cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa, em presença de *M. aeruginosa*, sob diferentes condições de salinidade: Controle (A*); 2S (B); (C) 5S e 10S (C).
 * Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

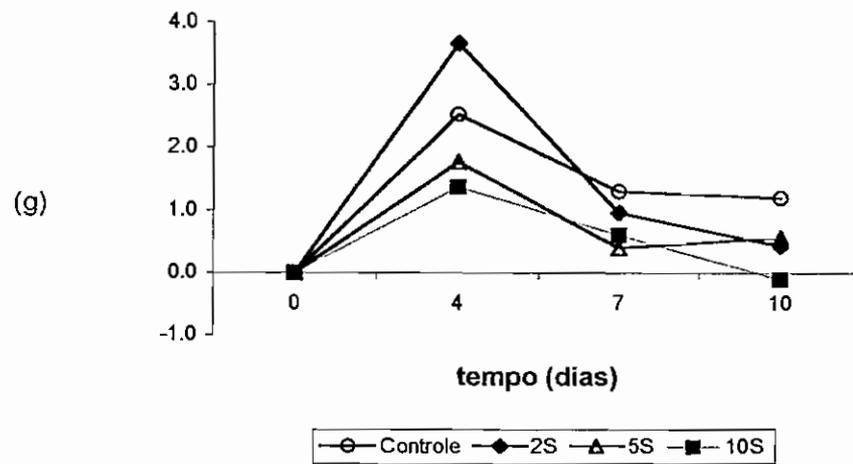


Figura 24 - Variação do peso úmido (g) de *E. crassipes*, cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa, em ausência de *M. aeruginosa*, sob diferentes condições de salinidade: Controle (A*); 2S (A); 5S (B) e 10S (B). *Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

testada foi a que maior dano trouxe à macrófita, sua ocorrência no meio natural poderia gerar maior disponibilidade de nutrientes no meio e um crescimento celular maior do que o constatado no experimento, podendo esse evento explicar os resultados observados no meio natural. Cabe considerar que foi utilizada apenas uma plântula por frasco no experimento.

Além disso, a luminosidade pode tornar-se outro fator limitante para *M. aeruginosa* nos períodos de grande desenvolvimento de *E. crassipes*, tornando sua eliminação ainda mais favorável ao desenvolvimento das microalgas e cianobactérias no meio.

Para testar a tolerância de *E. crassipes* ao aumento de salinidade, foi realizado um experimento em meio ASM-1 com água da lagoa nas mesmas condições de salinidade já testadas em presença (Fig. 23) e ausência (Fig. 24) de *M. aeruginosa*.

Os indivíduos de *E. crassipes* em meio com *M. aeruginosa* tiveram um crescimento inversamente proporcional à salinidade, mostrando a influência negativa da salinidade sobre essa população. Os indivíduos crescendo na condição de salinidade 10S demonstraram perda crescente de peso, não observando-se nenhum crescimento. Os indivíduos que cresceram em salinidade zero foram os mais bem sucedidos, o que também foi verificado a partir dos valores do rendimento máximo (R) (Tab. 10).

Comparando-se os rendimentos obtidos em cada condição, observou-se o maior valor em salinidade 0 e o menor em salinidade 10S. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey revelaram que o R da condição 10S foi diferente do rendimento da condição controle e da condição 2S, ao nível de significância (α) de 5%.

Dois estudos apontaram para intolerância dessa macrófita ao aumento de salinidade, que pode causar sua morte a partir de 20S (Petruccio, 1997) e perda d' água com necrose dos tecidos em 10S (Sharma e Edem, 1991, citado em Petruccio, 1997).

O crescimento de *E. crassipes* em meio sem *M. aeruginosa* teve resultado semelhante, embora em todas as condições de salinidade testadas tenha sido observado maior crescimento de aguapé em relação ao meio com *M. aeruginosa*. Os indivíduos na condição de salinidade 10S só perderam massa no final do cultivo e os da condição 5S não demonstraram perda líquida de peso.

O rendimento na condição 10S, entretanto, permaneceu sendo o menor dentre os quatro (Tab. 10). A ANOVA e o teste de Tukey demonstraram que as condições controle e 2S foram semelhantes entre si, assim como as condições 5S e 10S, e que as condições controle e 2S foram diferentes de 5S e 10S ao nível de significância (α) de 5%.

Porém, a comparação entre os rendimentos (R) de *Eichhornia crassipes* de cada condição de crescimento (0S, 2S, 5S e 10S), obtidos nos cultivos em presença e em ausência de *M. aeruginosa* (Figs. 21 e 22) revelaram, a partir da ANOVA e do teste de Tukey, ausência de diferença significativa entre as médias dos dois cultivos ($\alpha = 0,05$).

Diante da constatação do efeito positivo indireto do aumento de salinidade sobre o crescimento da cepa NPLJ-37 e considerando que lagoas costeiras são corpos d' água sujeitos a freqüentes variações de salinidade, cabe refletir sobre as conseqüências dessas variações ambientais sobre a toxicidade da população de *M. aeruginosa*, e em conseqüência sobre o ambiente como um todo.

A produção de microcistinas pela cepa NPLJ-37 foi investigada nas mesmas condições utilizadas nos cultivos anteriores.

O cultivo em meio ASM-1 com NaCl demonstrou maior produção de MC nas condições intermediárias de salinidade (2S e 5S), enquanto os menores valores foram observados nas condições extremas de salinidade testadas (controle - 0S e 10S) (Fig. 25 e Tab. 11). A concentração de MC normalizada para 10^6 células nas condições intermediárias foi em média 85% e 67% maior do que nas condições de salinidade 10S e 0S, respectivamente. A condição controle foi a de menor produção dessa toxina por célula.

A comparação entre os valores obtidos em cada condição de crescimento, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey demonstrou que existe diferença entre os 4 tratamentos ao nível de significância (α) de 5%.

Os valores obtidos para concentração de MC no cultivo em meio ASM-1 com água da lagoa, sem aguapé sob diferentes condições de salinidade (Fig. 26) foram maiores que os obtidos no crescimento com aguapé, com exceção da condição de maior salinidade, onde os valores no cultivo com aguapé foram sempre maiores.

Comparando-se a concentração de microcistinas/ 10^6 células para cada condição de crescimento, obtida no meio em ausência de *Eichhornia crassipes* a ANOVA e o teste de Tukey revelaram a existência de diferença entre os 4 tratamentos ao nível de significância (α) de 5%. Resultado semelhante foi obtido para os valores obtidos no meio com *E. crassipes*.

A concentração MC/ 10^6 células obtida em meio com a presença de aguapé (Fig. 27) foi significativamente diferente da obtida em ausência de aguapé. Somente os valores do 7º

MC/10⁶ células

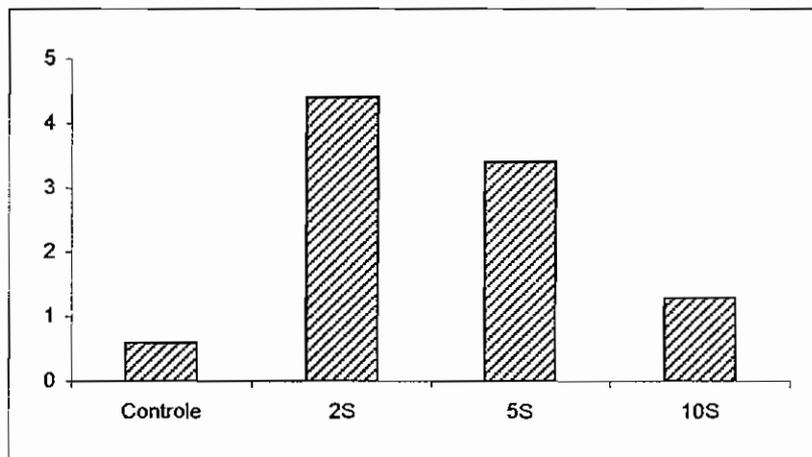


Figura 25 - Concentração de microcistinas (MC) na cepa NPLJ-37 normalizadas para 10⁶ células, cultivada em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade, obtidas por adição de NaCl - Controle (A*); 2S (B); 5S (C) e 10S(D).

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

Tabela 11 – Valores correspondentes a concentração de microcistinas (MC) na cepa NPLJ-37, cultivada (a) em meio ASM-1 sob diferentes condições de salinidade, obtidas por adição de NaCl; (b) em meio ASM-1 com água da lagoa sem aguapé, sob diferentes condições de salinidade e (c) em meio ASM-1 com água da lagoa, em presença de *E. crassipes*, sob diferentes condições de salinidade (Controle; 2S; 5S e 10S).

*Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes entre condições de cultivo e (•) significa resultados estatisticamente diferentes entre experimentos, ao nível de significância de 5%.

Meio de cultivo	Condição de cultivo	ng de microcistina /10 ⁶ células	ANOVA entre condições	ANOVA entre experimentos	
ASM-1 e NaCl	(a) Controle	0,7	A*		
	2S	5,5	B		
	5S	1,4	C		
	10S	0,8	D		
ASM-1 e água da lagoa sem aguapé	(c) Controle	4º dia	130	A	(•)
		7º dia	44		
		10º dia	53		(•)
	2S	4º dia	170	B	(•)
		7º dia	180		(•)
		10º dia	160		(•)
	5S	4º dia	80	C	(•)
		7º dia	150		(•)
		10º dia	94		(•)
	10S	4º dia	110	D	(•)
		7º dia	59		(•)
		10º dia	63		
ASM-1 e água da lagoa com aguapé	(b) Controle	4º dia	35	A	(•)
		7º dia	48		
		10º dia	70		(•)
	2S	4º dia	125	B	(•)
		7º dia	406		(•)
		10º dia	180		(•)
	5S	4º dia	94	C	(•)
		7º dia	416		(•)
		10º dia	103		(•)
	10S	4º dia	65	D	(•)
		7º dia	31		(•)
		10º dia	58		

dia de cultivo da condição controle e do 10º dia em 10S não foram significativamente diferentes segundo o Teste t, ao nível de significância de 5%.

Nos cultivos obtidos nas duas condições de salinidade intermediária (2S e 5S), a maior concentração de MC não foi observada na fase log, tanto no crescimento com aguapé como no crescimento sem aguapé. A condição controle sem aguapé teve a concentração máxima de MC no final fase log. Entretanto, os experimentos com aguapé foram desmontados com 10 dias de cultivo, em virtude da inviabilidade das plântulas, após esse período, principalmente nas maiores salinidades. Esse período não representa o início da fase estacionária, e sim o final da fase log, como pode ser observado nas curvas de crescimento da cepa NPLJ-37 (Figs. 17 e 20). A extração das toxinas foi feita nos 4º, 7º e 10º dias de cultivo.

A salinidade influenciou a concentração de microcistinas, sendo que a tendência para maior produção de microcistinas nas condições intermediárias de salinidade e para a menor produção nas condições extremas, mantiveram-se nos dois experimentos. Resultados semelhantes foram observados em estudo com cepas de ambiente costeiro brasileiro por Yunes *et al.* (2000), que demonstraram maior produção de MC nas salinidades intermediárias do que nas extremas. Esse resultado foi surpreendente, uma vez que os valores de salinidade intermediários (1,0S e 1,5S) e os valores extremos (0,5S e 2,5S) utilizados foram bastantes distintos daqueles testados no presente estudo. Experimentos realizados com *Nodularia spumigena* demonstraram valores máximos para o crescimento celular nos valores intermediários de salinidade (12S e 24S) e menor crescimento nas salinidades extremas (0S e 35S), mas o mesmo não foi observada para a produção de nodularina (Blackburn *et al.*, 1996).

Cabe considerar que as cepas testadas, oriundas dos diferentes ambientes, já apresentavam uma pré-adaptação aos diferentes valores de salinidade de seus locais de origem. Dessa forma, os valores intermediários de cada ambiente são na verdade a faixa mais freqüente de exposição à qual o organismo está adaptado e podem representar uma condição favorável para essas cepas. Paerl *et al.* (1984) registraram inibição severa da absorção de C inorgânico por *M. aeruginosa* em salinidade acima de 5S, enquanto que abaixo de 2S a inibição não foi tão pronunciada e pareceu ser até levemente estimulante. É provável que o gasto energético e metabólico, além dos diferentes requerimentos nutricionais para adaptação à cada condição de salinidade, sobretudo às condições

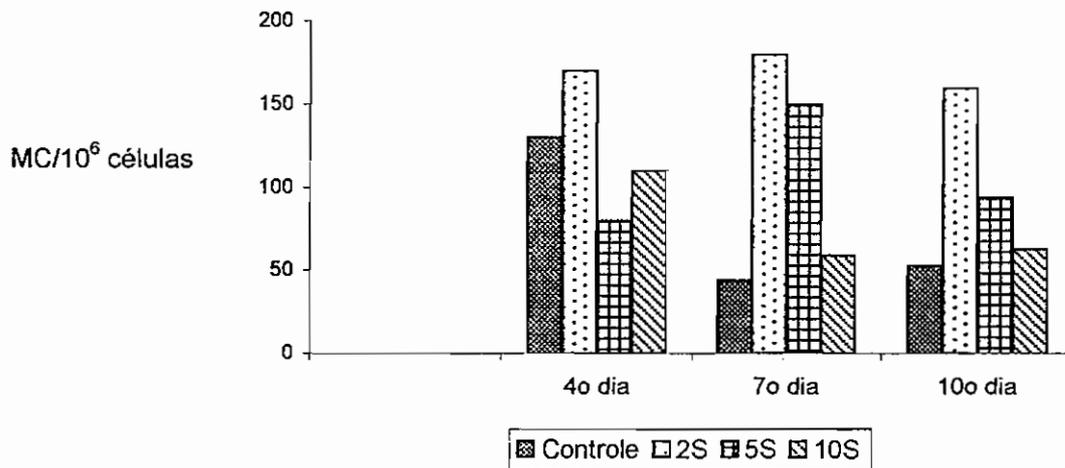


Figura 26 - Concentração de microcistinas (MC) na cepa NPLJ-37 normalizadas para 10^6 células, cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa em ausência de aguapé sob diferentes condições de salinidade: Controle (A*); 2S (B); 5S (C) e 10S (D) em ausência de aguapé.

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

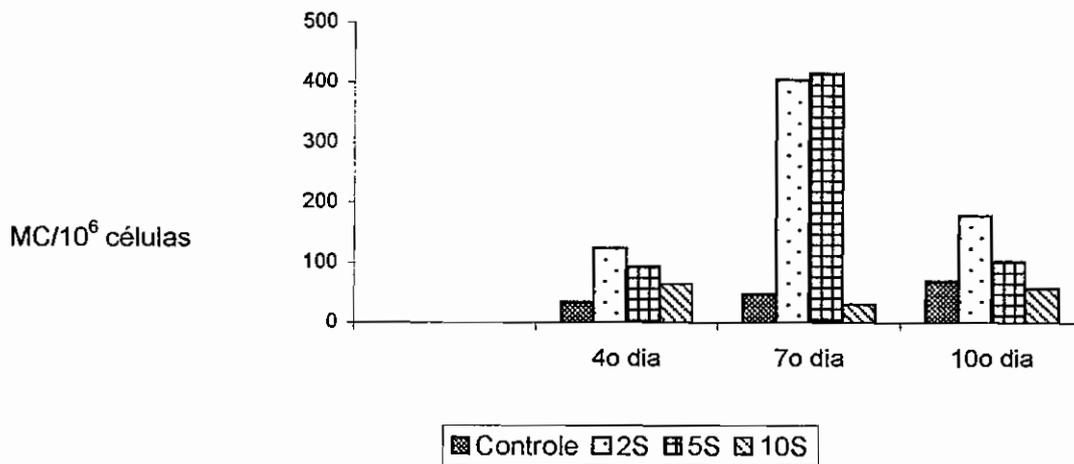


Figura 27 - Concentração de microcistinas (MC) na cepa NPLJ-37 normalizadas para 10^6 células, cultivada em meio ASM-1 com água da lagoa sob diferentes condições de salinidade: Controle (A*); 2S (B); 5S (C) e 10S (D) em presença de aguapé.

* Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5%.

extremas, resultem na diminuição da produção de certos metabólitos secundários pelas células, como microcistinas.

Ao mesmo tempo, a maior produção de microcistinas observada nos valores intermediários de salinidade representa um grave problema para o ambiente natural, sobretudo ambientes de transição entre o continente e o meio marinho, nos quais valores extremos de salinidade são os menos freqüentes e a dominância são as condições intermediárias entre os dois. Neste contexto os principais usos desses ambientes para a população: áreas de lazer e pesca tornam-se impróprios, com riscos à saúde de seus usuários. A importância de ambientes costeiros como berçários naturais de várias espécies de peixes e outros pescados, inclusive de importância econômica, que muitas vezes são capturados longe da fonte de contaminação, acrescenta um novo risco, uma vez que não há controle sobre as espécies que entram nesses ambientes para procriação e que podem ali contaminar-se, acumulando em seus tecidos concentrações elevadas de toxinas e trazer perigo para o consumo humano.

Dessa forma, o acelerado processo de eutrofização e assoreamento que, dentre outros fatores, tem levado a uma maior dificuldade de circulação da água do mar nessas lagoas costeiras, estaria também favorecendo a seleção de cepas tóxicas adaptadas a valores de salinidade facilmente encontrados nestes ambientes (2S a 5S), e com isso estendendo a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias de distribuição antes restrita ao meio continental a novos ambientes.

CONCLUSÕES

1) A dominância de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá esteve principalmente associada à salinidade, à disponibilidade de NO_3^- e NH_4^+ como fonte de nitrogênio, à transparência da água e à temperatura.

2) Clorofíceas e diatomáceas funcionaram como boas indicadoras de condições desfavoráveis ao desenvolvimento das indesejáveis cianobactérias tóxicas, uma vez que a biomassa de clorofíceas e de diatomáceas, em geral, estiveram se opondo a de cianobactérias, indicando diferentes estratégias de sobrevivência. Dessa forma, o conhecimento da dinâmica das populações fitoplanctônicas da Lagoa de Jacarepaguá mostrou-se importante para o monitoramento das condições do ambiente. Informações sobre a estrutura e dinâmica dessa comunidade, como associação de espécies dominantes, biomassa e composição taxonômica são de interesse fundamental para o entendimento desse ecossistema.

3) A biomassa máxima de *M. aeruginosa* foi verificada no período de máxima salinidade (10S), coincidindo com o desaparecimento das macrófitas aquáticas (principalmente *Eichhorina crassipes*) da região, que demonstraram ser afetadas pelo aumento da salinidade. Ao mesmo tempo o período de menor desenvolvimento de biomassa de cianobactérias coincidiu com alta biomassa de *E. crassipes*. Resultados obtidos a partir de dados experimentais revelaram que a salinidade não é em si um fator favorável ao desenvolvimento de *M. aeruginosa*, embora as cepas testadas tenham demonstrado crescimento até 10S.

4) Ao mesmo tempo, os experimentos revelaram que a salinidade de 10S limitou fortemente o desenvolvimento de *E. crassipes*, em relação aos demais valores testados. Os resultados revelaram ainda que *M. aeruginosa* em meio de salinidade 10S teve maior crescimento em presença da macrófita, do que no meio sem *E. crassipes*, indicando que os danos causados pela salinidade ao aguapé representam um fator positivo para o desenvolvimento da cianobactéria.

5) Uma provável competição entre a comunidade fitoplanctônica e a de macrófitas exerce o

papel de controle sobre o desenvolvimento das populações de cianobactérias. Essa competição foi eliminada pelo aumento de salinidade, em favor de *Microcystis aeruginosa*. Pescadores locais demonstram ter conhecimento da existência de um ciclo de alternância entre as duas comunidades quando afirmam que a mancha verde (*M. aeruginosa*) é a semente da gigoga (*E. crassipes*). Essa conclusão revela a observação do fenômeno de alternância entre as duas comunidades que pode ter sido entendido da seguinte forma: antes da gigoga morrer, lança suas sementes na água, e quando as sementes se desenvolvem, e portanto desaparecem, as macrófitas atingem seu crescimento máximo.

6) A presença do aguapé pode ter exercido algum tipo de controle sobre a produção de microcistina pela cepa NPLJ-37 e evidencia seu uso potencial para o controle do crescimento e toxidez de *M. aeruginosa* em futuros planos de manejo na Lagoa de Jacarepaguá. Uma medida que a princípio mereceria especial atenção seria o monitoramento das condições de salinidade, que afetam drasticamente *Eichhornia crassipes*, no sentido de evitar a disponibilização dos nutrientes incorporados na biomassa do aguapé para a comunidade de cianobactérias. Valores da salinidade próximos a 10S deveriam caracterizar um estado de alerta, quando poderia organizar-se uma estrutura que garantisse rápida intervenção no sentido de retirar-se a biomassa de aguapé acumulada na lagoa antes de iniciar sua decomposição.

7) Foi observada alta correlação direta entre concentração de microcistina ($\mu\text{g/L}$) e a biomassa de *M. aeruginosa* ($r= 0,87$), o que explica a existência das mesmas variáveis ambientais influenciando as duas respostas.

8) Os maiores valores da quota celular no ambiente natural foram observados durante o período de ocorrência de colônias jovens. A quota celular demonstrou fraca correlação direta com os nutrientes disponíveis (NH_4^+ , NID) e com a razão destes (NID/PO_4^{-3}), o que já havia sido observado em outros estudos de campo e de laboratório.

9) A concentração de microcistinas na Lagoa de Jacarepaguá foi regulada principalmente pela biomassa de *M. aeruginosa*, uma vez que a maior quota celular de MC foi registrada para as colônias jovens e com menor biomassa.

10) A produção de microcistina foi influenciada por variações externas de salinidade, em condições experimentais. A maior produção de microcistinas foi observada nos valores intermediários das salinidades testadas, evidenciando o risco da presença de *M. aeruginosa* para o ambiente, uma vez que são essas as condições mais frequentemente registradas para esse meio. Os estudos de campo não demonstraram correlação significativa entre salinidade e a quota celular de microcistina em *M. aeruginosa*, uma vez que não houve resposta linear da produção de MC em respeito à salinidade. Cabe ainda ressaltar que as observações realizadas no ambiente natural são o resultado do conjunto de várias populações de cepas, enquanto que o estudo experimental foi realizado apenas com uma cepa, o que pode limitar a interpretação dos resultados.

11) São necessários mais estudos no ambiente natural que investiguem as condições ambientais que influenciam a concentração de microcistinas no meio e a quota celular dos organismos produtores.

12) A evidência da existência de cepas de *M. aeruginosa* halotolerantes revela a necessidade de uma mudança na abordagem da ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas em ambientes costeiros. Essa ocorrência representa um problema para o ecossistema e para o homem, uma vez que lagoas costeiras e estuários são berçários para a reprodução de muitas espécies de animais e de peixes de interesse comercial que podem acumular a toxina. A presença de microcistinas na Lagoa de Jacarepaguá oferece um risco real para seus frequentadores. A principal vocação do ambiente é para pesca e uso recreacional. A presença de microcistina LR já foi confirmada em vísceras, fígado e nos músculos de peixes da Lagoa de Jacarepaguá, representando um risco potencial para seus usuários e um grave problema de saúde pública, uma vez que não há controle do comércio e destino dos peixes ali pescados.

13) Considerando-se que as concentrações recomendáveis pela OMS são de até 20.000 células/ml para águas de uso recreacional e que o rápido, irreversível e severo dano ao fígado causado por microcistinas exige medidas preventivas, uma vez que terapia tem muito pouco ou nenhum valor, torna-se enfaticamente recomendável medidas mitigadoras das florações de cianobactérias nesse ambiente. Diante dos fatos acima relatados, a Lagoa

de Jacarepaguá deveria estar incluída num amplo programa de monitoramento e de manejo para controlar o desenvolvimento dessas algas tóxicas e o uso desse corpo d'água pela população.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ COBELAS, M. & JACOBSEN, B. A. 1992. Hypertrophic phytoplankton: an overview. **Freshwat. Forum.**, 2:184-199.
- AZEVEDO, S.M.F.O. E CARMOUZE, J.-P., 1994. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophyceae. Coïncidence ou conséquence? **Rev. Hydrobiol. trop.** 27(3): 265-272.
- BARICA, J.; KLING, H. E GIBSON, J., 1980. Experimental manipulation of algal bloom composition by nitrogen addition. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 37: 1175-1183.
- BARNES, R.S.R. Coastal Lagoons. 1980. The natural history of a neglected habitat. Cambridge, Cambridge University Press. 100p.
- BLACKBURN, S.I., MCCAUSLAND, M.^a, BOLCH, C.J.S., NEWMAN, S.J. AND JONES, G.J., 1996. Effect of salinity on growth and toxin production in cultures of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* from Australian waters. **Phycologia**, 35 (6): 511-522.
- BLOMQUIST, P. PETTERSSON, A. AND HYENSTRAND, P., 1994. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen fixing cyanobacteria in aquatic systems. **Arch. Hydrobiol.**, 132(2):141-164.
- BLUMWALD, E. E TEL-OR, E., 1982. Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*. **Arch. Microbiol.**, 132:168-172.
- BRANCO, C.W.C. E SENNA, P.A.C., 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies**, 75:85-96.
- BULGAKOV, N.G. E LEVICH, A.P., 1999. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. **Arch. Hydrobiol.**, 146(1):3-22.
- CALJON, A.G., 1983. Brackish-water phytoplankton of the Flemish lowland. **Dev. Hydrobiol.**, 48: 1-272.
- CALLEGARO, V.L.M.; ROSA, Z.M. & WERNER, V.R. 1981. Comunidades fitoplanctônicas das Lagoas de Tramandaí e do Armazém, Tramandaí, Rio Grande Do Sul. Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., 28:3-16.
- CANFIELD, D.E.; PHILIPS, E. JR. E DUARTE, C.M., 1989. Factors influencing the abundance of blue-green algae in Florida lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 46: 1232-1237.
- CARACO, N.F. E MILLER, R., 1998. Effects of CO₂ on competition between a cyanobacterium and eukaryotic phytoplankton. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 55:54-62.

- CARMICHAEL, W.W. E GORHAM, P.R., 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria (blue-green algae). In: CARMICHAEL, W.W. (Ed.) *The Water Environment: Algal Toxins and Health*, Plenum Press, New York, 161-172.
- CARMICHAEL, W.W., 1992. A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue Green Algae) and their Toxins. EPA/600/R-92/079, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- CARMICHAEL, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scient. Amer.*, 270 (1):64-71.
- CARMICHAEL, W.W., 1996. Toxic *Microcystis* and the environment In WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (Eds.) *Toxic Microcystis*. CRC Press, New York. 1-12.
- CARMOUZE, J.-P., 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. ORSTOM. SBL. Edgard Blücher, 254 p.
- CHORUS, I. E BARTRAM, J. (EDS.). 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & Fn Spon – London. 416 p.
- CODD, G.A. E POON, G.K., 1988. Cyanobacterial toxins: In: GALLON, J.G. E ROGERS, L.J. (Eds.) *Proc. Phytochem. Soc. Europe*, 28, Oxford University Press, Oxford, 283-296.
- CODD, G.A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Engineer.*, (16): 51-60.
- COMÍN, F.A., 1984. Características físicas y químicas y fitopláncton de las lagunas costeras, Encañizada, Tancada y Buda (Delta del Ebro). *Oecolog. Aquat.*, 7: 79-162.
- COSTA, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O., 1994. Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas. *Iheringia, Sér. Bot.*, (45):69-74.
- COUSINS, I.T.; BEALING, D.J.; JAMES, H.A. E SUTTON, A., 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Wat. Res.*, 30: 481-485.
- COUTO, E.C.G., 1989. Produção, Decomposição e Composição Química de *Typha domingensis* Perf. (Typhaceae) no Sistema Lagunar de Guarapina. RJ. Niterói, 249p. Dissertação. (mestrado em Geoquímica) - Universidade Federal Fluminense.
- DARLEY, W.M., 1982. *Algal Biology: A Physiological Approach*. Blackwell. Oxford. 168p.
- DAWSON, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36: 953-962.

- DITTMANN E.; NEILAN, B.A.; ERHARD, M.; von DOHREN, H. E BORNER, T., 1997. Insertional mutagenesis of peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Mol. Microbiol.**, 26(4): 779-787.
- DOMINGOS, P. 1991. Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica e Produção Primária na Lagoa de Saquarema, RJ. Dissertação de Mestrado. Depto. Geoquímica - Universidade Federal Fluminense.
- DOMINGOS, P.D.; HUSZAR, V. & CARMOUZE, J.-P. 1994. Composition et biomasse de phytoplancton d'une lagune tropical (Brésil) marqué par une mortalité de poisson. **Rev. Hidrobiol. trop.**, 27(3):235-250.
- DOMINGOS, P; RUBIM, K.T.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O. E CARMICHAEL, W.W. 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply. **Environ. Toxicol.**, 14:31-35.
- DUARTE, C.M. E AGUSTÍ, S., 1992. Patterns in phytoplankton community structure in Florida lakes. **Limnol. Oceanogr.**, 37(1): 155-161.
- EDLER, L. (Ed.) 1979 . Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. Baltic Marine Biologists. WG9. BMB. Publ. 38p.
- ERDMANN, N., FULDA, S. E HAGEMANN, M., 1992. Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 138: 363-368.
- FALCONER, I.R., 1991. Tumor Promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 6:177-184.
- FALCONER, I.R., 1999. An overview of problems caused by a toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. **Environ. Toxicol.**, 14 (1):5-12.
- FAY, P., 1983. The blue-greens. London, Edward Arnold. 88 pp. (Studies in Biology nº 160)
- FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. 1982. Estudo do Complexo Lagunar da Barra da Tijuca – Fase I: Lagoa de Jacarepaguá. 37p.
- FEEMA - Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. 1984. Quadro da situação ambiental da Baixada de Jacarepaguá. Rio de Janeiro. DIPLAN. 107 f.
- FERNANDES, V.O., 1993. Estudos Sucessionais da Comunidade Perifítica em Folhas de *Typha domingensis* Pers, Relacionados às Variáveis Limnológicas na Lagoa de Jacarepaguá, RJ. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.

- FERRÃO-FILHO, A. S., 1998. Influências das Florações de Cianobactérias na Dinâmica de Populações Zooplanctônicas da Lagoa de Jacarepaguá (RJ): Efeitos Tóxicos de *Microcystis aeruginosa* sobre Cladóceros. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biofísica. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- FOGG, G.E. E THAKE, B. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press. Third Ed. 269p.
- FUJIKI, H., SUEOKA, E. E SUGANUMA, M., 1996. Carcinogenesis of microcystins. In Watanabe, M.F., Harada, K., Carmichael, W.W. e Fujiki, H (Eds.) Toxic *Microcystis*. CRC Press. Nova York. 262 p.
- GANF, G.G., 1974. Diurnal mixing and the vertical distribution of phytoplankton in a shallow equatorial lake (Lake George, Uganda). *J. Ecol.*, 62 (2): 611-629.
- GORHAM, P.R.; McLACHLON, J.R.; HAMMER, V.T. & KIM, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 15:796-804.
- HANEY, J.F., 1987. Field studies on zooplankton-Cyanobacteria interactions. *New Zealand J. mar. Freshwat. Res.*, 21: 467-475.
- HAPPEY-WOOD, C. 1988. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: Sandgren, C.D. (ed.), Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: 175-227.
- HARADA, K., 1996. Chemistry and detection of microcystins. In WATANABE, M.F., HARADA, K., CARMICHAEL, W.W. E FUJIKI, H (Eds.) Toxic *Microcystis*. CRC Press. Nova York. 262 p.
- HELLEBUST, J.A. 1976. Osmoregulation. *Ann. Ver. Plant. Physiol.*, 27:485-505.
- HUBER-PESTALOZZI, G. 1950. Cryptophyceen, Chloromonadien, Peridineen. In: HUBER-PESTALOZZI, G. Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 3. Teil. Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. 310p.
- HUSZAR, V.L.M. 1989. Considerações sobre o fitoplâncton da Lagoa de Juturnaíba, Araruama, Rio de Janeiro, Brasil. *Revta. bras. Biol.*, 49: 107-123.
- HUSZAR, V.L.M. E SILVA, L.H.S., 1999. Limnotemas. A estrutura da Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudos. Soc. Bras. Limnologia. V. 2.
- HUSZAR, V.L.M.; SILVA, L.H.S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P. E SANT'ANNA, C.L., 2000. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiol.*, 424:67-77.

- JENSEN, J.P.; JEPPESEN, E.; OLRIK, K. AND KRISTENSEN, P. 1994. Impact of nutrientes and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 51: 1692-1699.
- JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., NA J., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B. DE C., FILHO D.A. DE M., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, S.M.F.O. AND JARVIS, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcistins at a haemodialysis center in Brazil. **New Engl. J. Med.**, 338 (13): 873-878.
- KEATING, K.I., 1978. Blue-green algal inhibition of diatom growth/transition from mesotrophic community structure. **Science**, 199 (3): 971-973.
- KILHAM, S.S.; KREEGER, D.A.; GOULDEN, C.E. E LYNN, S.G., 1997. Effects of algal food quality on fcundity and population growth rates of Daphnia. **Freshwat. Biol.**, 38: 639-647.
- KIRK, J.T.O., 1983. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 401 p.
- KJERFVE, B. (ed.), 1994. Coastal Lagoon Processes. Elsevier Sci. Publ. 577 pp.
- KNOPPERS, B.A. E MOREIRA, P.F., 1990. Material em suspensão e sucessão fitoplancônica na Lagoa de Guarapina, RJ. **Acta Limnol. Bras.**, (3):291-317.
- KOMARÉK, J. E ANAGNOSTIDIS, K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes4 – Nostocales. **Arch. Hydrobiol. Suppl.** 82 (3): 247-345.
- KOMARÉK, J. E ANAGNOSTIDIS, K., 1999. Cyanoprokaryota. Chroococcales. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H. E Mollehnauer, D. (Org.) Sübwasserflora von Mitteleuropa. 19/1. Gustav Fisher. 548p.
- KOMARÉK, J. E FOTT, B. 1983. CHLOROPHYCEAE, CHLOROCOCCALES . In: Huber-Pestalozzi, G. (Ed.) Das Phytoplankton des Sübwassers; Systematik und Biologie. V. 7(1). Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. 1044p.
- KONRATH, J.; TEDESCO, C.D. & SCHWARZBOLD, A. 1997. Structural interchanges of phytoplanktonic and periphytic microalgae communities of a Southern Brazilian coastal lake. **Verh. int. Verein. Limnol.**, 26:1483-1486
- KOTAK, B.G.; LAM, A. K.-Y.; PREPAS, E.E.; KENEFICK, S.L. AND HRUDEY, S.E., 1995. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. **J. Phycol.**, 31: 248-263.
- KOTAK, B.G.; LAM, A. K.-Y.; PREPAS, E.E. E HRUDEY, S.E., 2000. Role of chemichal and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 57:1584-1593.

- KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W.W. & SARVER, E.W. 1986. Toxic peptides from freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, 29:221-228.
- LAHTI, K.; RAPALA, J.; FÄRDIG, M.; NIEMELÄ, M. E SIVONEN, K., 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, in particulate material and dissolved in lake water. **Wat. Res.**, 31: 1005-1012.
- LINDHOLM, T., ERIKSSON, J.E. REINIKAINEN, M. & MERILUOTO J.A.O., 1992. Ecological effects of hepatotoxic cyanobacteria. **Environ. Toxicol. Wat. Qual.**, 7:87-93.
- LUKAC, M. & AEGERTER, R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 31 (3): 293-305.
- LUND, J.W.G., KIPPLING, C. E LECREN, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating by counting. **Hydrobiol.**, 11: 143-170.
- MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. **J. Biol. Chem.**, 140: 315-322.
- MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M. E AZEVEDO, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, 39: 1077-1085.
- MELO, S. & SUZUKI, M.S. 1998. Variações temporais e espaciais do fitoplâncton das lagoas Imboassica, Cabiúnas e Comprida. *In*: Esteves, F.A. (Ed.). Ecologia de lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Rio de Janeiro, UFRJ. p. 177-203.
- MOLICA, R.J.R., 1996. Efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de microcistinas em duas cepas de *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin (Cyanophyceae). Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 88p.
- MORRIS, R.J.; WILLIAMS, D.E.; LUU, H.A; HOLMES, C.F.B.; ANDERSEN, R.J. AND CALVERT, S.E., 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. **Toxicon**, 38: 303-308.
- MOSS, B., 1973. The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: An experimental study. II. The role of pH and carbon dioxide-bicarbonate system. **J. Ecol.**, 61: 157-211.
- MYKLESTAD, S. E HAUG, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (gran) Hustedt. I – Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 9: 125-136.

- NISHIWAKI-MATSHUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGUNUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T. CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 118:420-424.
- OECD, 1992. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD, Paris. 154 pp.
- OHTAKE, A.; SHIRAI, M.; AINDA, T.; MORI, N.; HARADA, K.; MATSURA, K.; SUZUKI, M. E NAKANO, M., 1989. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55: 3202-3207.
- ORR, P. AND JONES, G.J., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnol. Oceanogr.**, 43 (7): 1604-1614.
- PADISÁK, J. E REYNOLDS, C.S., 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. **Hydrobiol.**, 384: 41-53.
- PAERL, H.W., 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. **Phycologia**, 35 (6) suppl.: 25-35.
- PAERL, H.W. E MILLIE, D.F., 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. **Phycologia**, 35: 160-167. Suppl.
- PAERL, H.W., 1988. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) In: SANDGREN, C.D. (ed.), Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: 261-315.
- PAERL, H.W.; BLAND, P.T.; BLACKWELL, J.H. AND BOWLES, N.D. 1984. The effects of salinity on the potential of a blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) bloom in the Neuse River Estuary, NC. **North Carolina Sea Grant Report**. 84-1. Raleigh, NC. 34pp.
- PALMER, C.M., 1969. A composite rating of algae tolerating organic pollution. **J. Phycol.**, 5(1):78-82.
- PARK, H. E WATANABE, M.F., 1996. Toxic *Microcystis* in eutrophic lakes. In: WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W. E FUJIKI, H. Toxic *Microcystis*. CRC Press, Nova York: 57-78.
- PETRUCIO, M.M., 1998. Variações das concentrações de nitrogênio e fósforo na água em presença de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ecologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 71p.

- PETTERSSON, K.; HERLITZ, E. E ISTVANOVICS, V. 1993. The role of *Gloeotrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in Lake Erken. **Hydrobiol.**, 253:123-129.
- PIMENTEL, A.C.P., 1997. Estudo Ecofisiológico de *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (Cyanophyceae) e produção de microcistina em cultivos unialgais e mistos. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal. 95p.
- RAVEN, J. A., 1991. Implications of inorganic carbon utilization: ecology, evolution, and geochemistry. **Can. J. Bot.**, 69: 908-924.
- REED, R.H. AND STEWART, W.D.P., 1988. The responses of cyanobacteria to salt stress. In: ROGERS, L.J. AND GALLON, J.R (Eds.) Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Pp.217-231. Oxford University Press, Oxford.
- REYNOLDS, C.S., 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. 384 pp.
- REYNOLDS, C.S., 1987. Cyanobacterial water-blooms. In CALLOW, J. (ed.), Advances in Botanical Research, Vol. 13, Academic Press, London: 67-143.
- REYNOLDS, C.S., 1997. Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory, Ecology Institute, Germany: 371 p.
- REYNOLDS, C.S., 1999. Non-determinism to probability, or N/P in the community ecology of phytoplankton. **Arch. Hydrobiol.**, 146 (1):23-35.
- ROBARTS, R.D. E ZOHARY, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. **New Zealand J. mar. Freshwat. Res.**, 21:391-399.
- ROUND, F.E.; CRAWFORD, R.M. E MANN, D.G., 1996. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge. 747 p.
- RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R., JACKSON, A.R.B. E McINNES, A., 1983. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* cultures. **Toxicon**, Suppl. 3: 377-380.
- SAIEG-FILHO, E., 1986. Ecologia do Fitoplâncton Marginal nas Lagunas da Baixada de Jacarepaguá, Rio de Janeiro-RJ. Monografia de Bacharelado. Instituto de Biologia - Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). 150p.
- SCHELSKE, C.L., 1984. *In situ* and natural phytoplankton assemblage bioassays. In: SCHUBERT, L.E. (Ed.) Algae as ecological indicators. Academic Press. London, 15-47.
- SELLNER, K.G., 1997. Physiology, ecology, and toxic porpoerties of marine cyanobacteria blooms. **Limnol. Oceanogr.**, 42 (5): 1089-1104.

- SEMERARO, J. E COSTA, A. F., 1972. O Plâncton e a Poluição nas Lagoas da Tijuca, Camorim e Jacarepaguá. XIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária, Assunção, Paraguai. Tema 4, Publ. no. 3:31p.
- SHAPIRO, J., 1973. Blue-green algae. Why they become dominant. *Science*, 179: 382-384.
- SHAPIRO, J. 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. int.Verein. theor. angew. Limnol.*, 24(1): 38-54.
- SHAPIRO, J., 1997. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwat. Biol.*, 37:307-323.
- SHIRAI, M.; MATUMARU, K. E OHTAKE, A. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2569-2571.
- SIVONEN, K., 1990. Effects of light, temperatura, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2658-2666.
- SMAYDA, T.J., 1980. Phytoplankton species sucesion. In: MORRIS, I. (Ed.). The Physiological Ecology of Phytoplankton. Oxford, Blackwell. 493-570. (Studies in Ecology 7)
- SMETACEK, V., 1975. Die Sukzession des Phytoplankton in der Westlichen Kieler Bucht. Kiel, univ. Kiel, 152 p.
- SMITH, V.H., 1982. The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: Na empirical and theoretical analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 27(6):1101-1112.
- SMITH, V.H., 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, 221: 669-671.
- SMITH, V.H., 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Can.J.Fish. Aquat. Sci.*, 43: 148-153.
- SMITH, V.H.; BENNETT, S.J., 1999. Nitrogen:phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. *Arch. Hydrobiol.*, 146 (1): 37-53.
- SOMMER, U., 1988. Growth and survival strategies of planktonic diatoms. In SANDGREN, C.D. (ed.), Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge: 227-260.
- SOMMER, U.; GLIWICZ, Z.; LAMPERT, W. E DUNCAN, A. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hidrobiol.*, 106: 433-471.

- STOCKNER, J.G. E ANTIA, N.J., 1986. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 43:2472-2503.
- STRATHMANN, R.R., 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. **Limnol. Oceanogr.**, 12: 411-418.
- TALLING, J.F., 1986. The seasonality of phytoplankton in African lakes. **Hydrobiol.**, 138: 139-160.
- TANDEAU DE MARSAC, N. E HOUMARD, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiol. Rev.**, 104: 119-190.
- TILMAN, D.; KIESLING, R.; STERNER, R.; KILHAM, S.S. E JOHNSON, F.A., 1986. Green, blue-green and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. **Arch Hydrobiol.**, 106 (4): 473-485.
- TRIMBEE, A.M. E PREPAS, E.E., 1987. Evaluation of total phosphorus as a predictor of the relative biomass of blue-green algae with emphasis on Alberta lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 44:1337-1342.
- TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M.F.; SUZUKI, M. AND HARADA, K.-I. 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. **Environm. Sci. Technol.** 28: 173-177.
- UHELINGER, V., 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Arch. Sci.**, 17 (2): 121-223.
- UTHERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativem Phytoplankton Methodik. **Mitt. int. Verein. Limnol.**, 9: 1-38.
- UTKILEN, H. e GJØLME, N., 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58 (4): 1321-1325.
- VAN DER WESTHUIZEN, A.J. E ELOFF, J.N., 1983. Effecto of culture age and pH of vulture medium on the growth and toxicity of blue green algae *Microcystis aeruginosa*. **Zeit. Pflanzenphysiol.**, 110: 157-163.
- VAN DER WESTHUIZEN, A.J. E ELOFF, J.N., 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006)*. **Planta**, 163:55-59
- VAN DER WESTHUIZEN, A.J.; ELOFF, J.N. E KRÜGER, G.H.J., 1986. Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). **Arch. Hidrobiol.**, 108: 145-154.

- WATANABE, M. F. E OISHI, S., 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49 (5): 1342-1344.
- WATANABE, M.; KAYA, K. AND TAKAMURA, N. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. **J. Phycol.**, 28: 761-767.
- WATANABE, M.F. *et al*, 1996. Production of microcystins. In WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. (Eds.) *Toxic Microcystis*. CRC Press, New York. 262 p.
- WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; OISHI, S.; WATANABE, Y. E SUZUKI, M., 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). **J. Appl. Phycol.**, 1: 161- .
- WATSON, S.B.; MCCAULEY, E. E DOWNING, J.A., 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. **Limnol. Oceanogr.**, 42:487-495.
- WELKER, M. ND STEINBERG, C. 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. **Wat. Res.**, (33): 1159-1164.
- WICKS, R.J. E THIEL, P.G., 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. **Environ. Sci. Technol.**, 24 (9): 1413-1418.
- YUNES, J.S., 2000. Ecotoxicologia em Lagoas Costeiras - Florações de Cianobactérias Tóxicas na Laguna dos Patos. In ESTEVES, F.A. E LACERDA, L.D. (Eds.). *Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras*. NUPEM/UFRJ. 394 p.
- YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATTHIENSEN, A. E CODD, G.A. 1998. *Microcystis aeruginosa* blooms and salinity in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. 4th International Congress Toxic Cyanobacteria, Beaufort, NC, USA, 27th Sep-2nd Oct.
- ZEE, D.M.W., 1994. Estudo Ambiental: Poluição dos Recursos Hídricos da Baixada de Jacarepaguá. Relatório Técnico, Depto. De Oceanografia, UERJ. 75p.
- ZEVENBOOM, W. E MUR, L.R., 1980. N₂-fixing cyanobacteria: why they do not become dominant in Dutch, hypertrophic lakes. **Dev. Hydrobiol.**, 2:123-130.
- ZHANG, Y. E PREPAS, E.E., 1996. Regulation of the dominance of planktonic diatoms and cyanobacteria in four eutrophic hardwater lakes by nutrients, water column stability, and temperature. **Can. J. Aquat. Sci.**, 53:621-633.
- ZOHARY, T. AND ROBERTS, R.D., 1989. Diurnal mixed layers and the long term dominance of *Microcystis aeruginosa*. **J. Plank. Res.**, 11(1): 25-48.

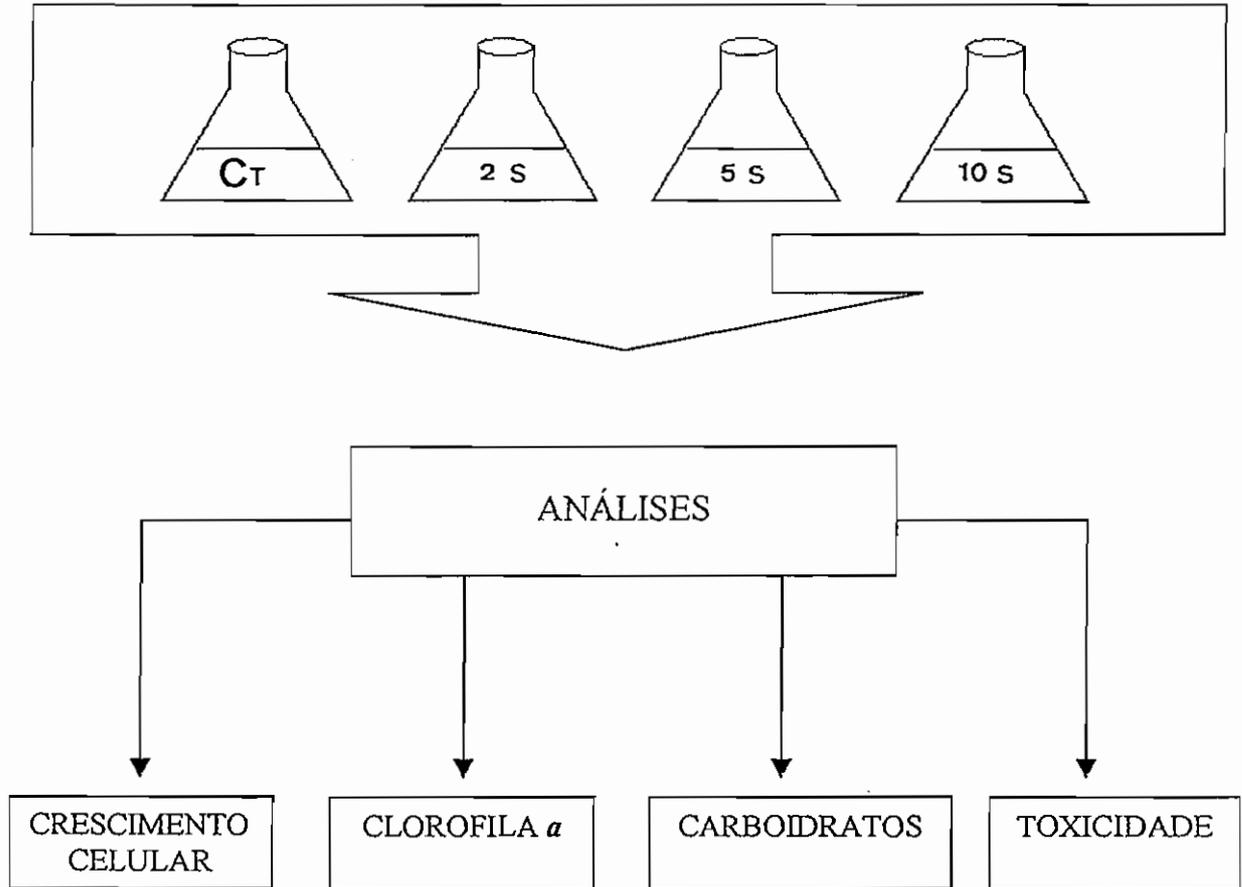
ANEXO 1

Diagrama dos Experimentos do Capítulo III

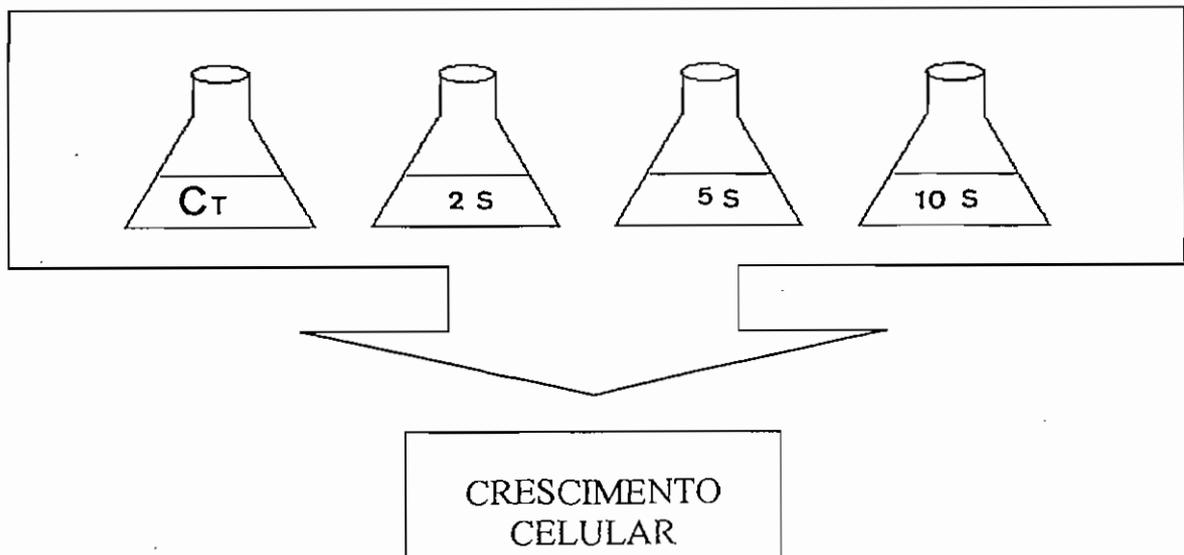
ANEXO 1

EXPERIMENTOS

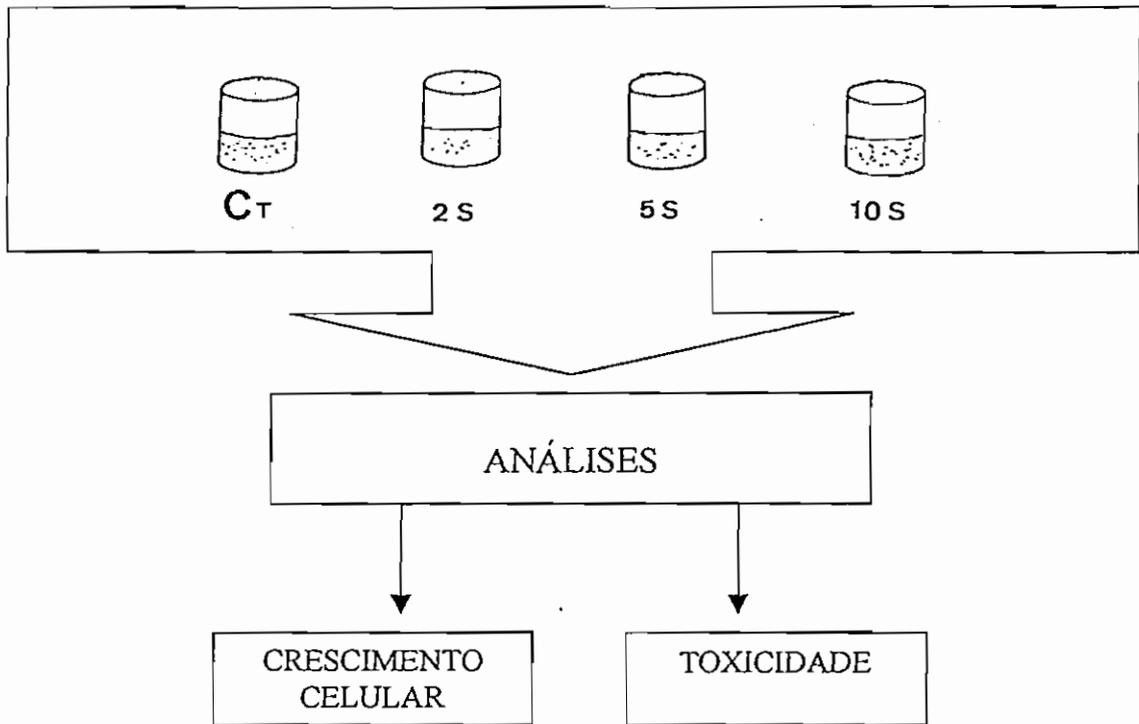
Cultivo de *M. aeruginosa* no meio ASM-1 e NaCl



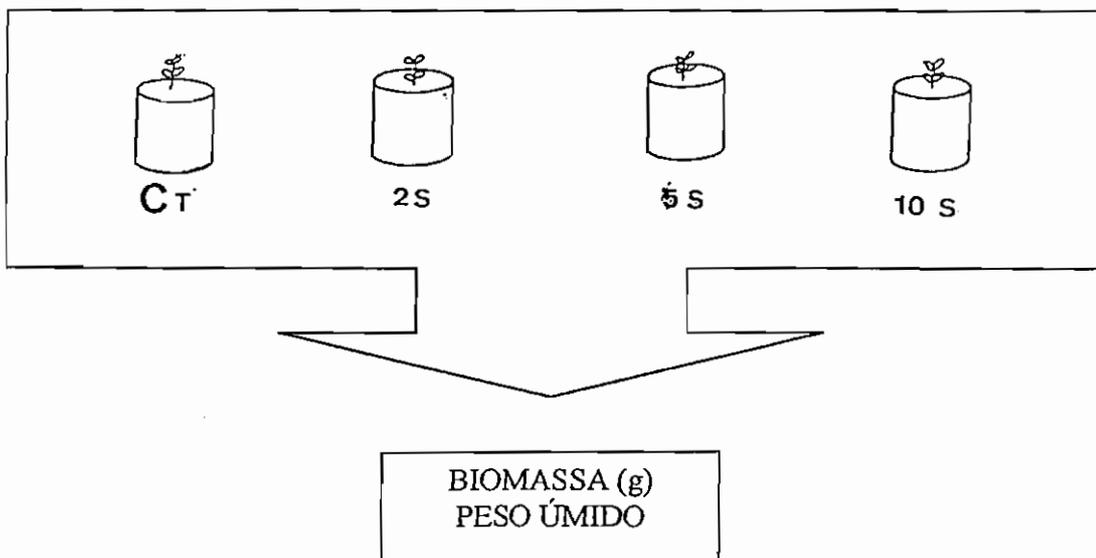
Cultivo de *M. aeruginosa* no meio ASM-1 e água da lagoa



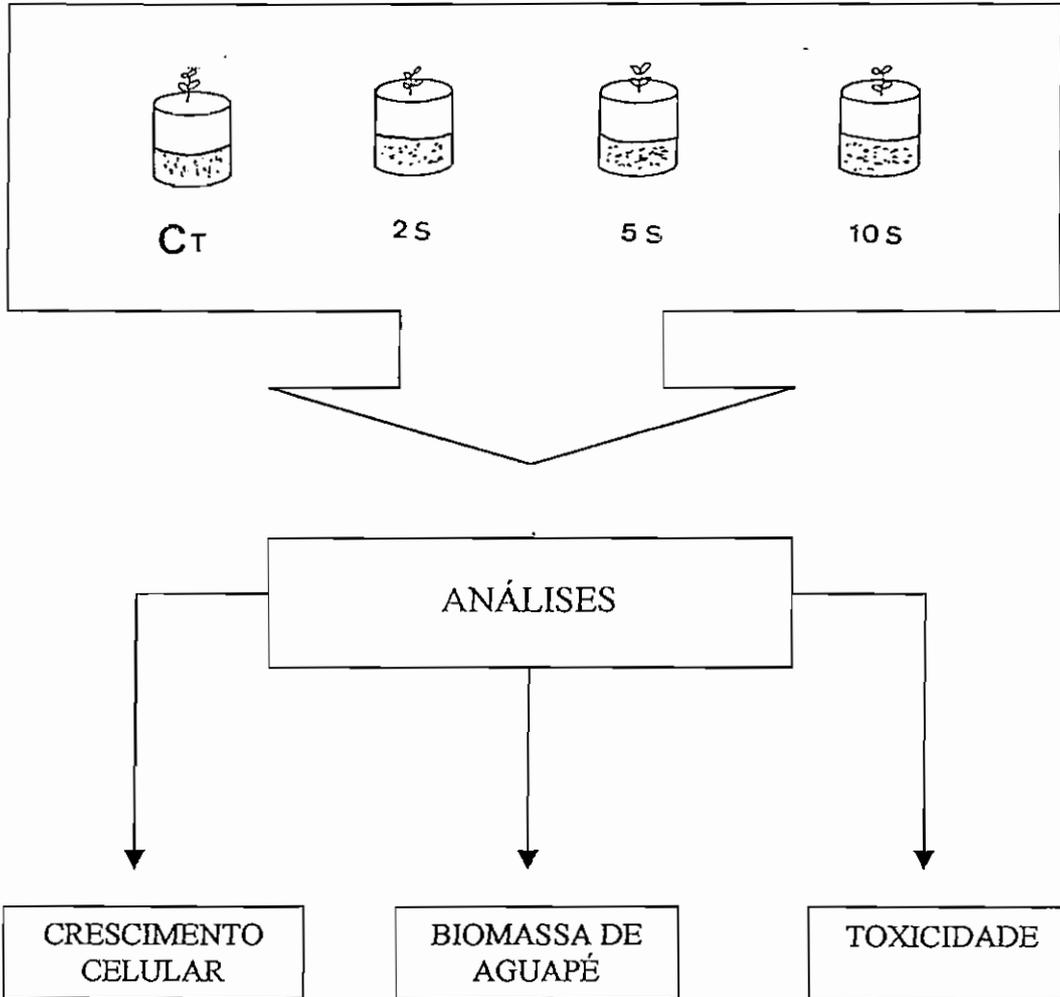
Cultivo de *M. aeruginosa* com ASM-1 e água da lagoa
sem *E. crassipes*



Cultivo de *Eichhornia crassipes* com ASM-1 e água da lagoa



Cultivo de *M. aeruginosa* e *E. crassipes* com ASM-1 e água da lagoa



ANEXO 2

Trabalhos publicados no período de desenvolvimento da Tese

TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

no periódico

Archives für Hydrobiologie

Background of the Caruaru tragedy; a case taxonomic study of toxic cyanobacteria

By Jiří Komárek^{1,4}, Sandra M.F.O.Azevedo², Patricia Domingos²,
Jaroslava Komárková^{1,5} and Martin Tichý³

¹ University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic

² Federal University of Rio de Janeiro, Biophysics Institute CCF – PG. Biotecnologia Vegetal, Rio de Janeiro, Brazil

³ Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Microbiology, Department of Autotrophic Microorganisms, Třeboň, Czech Republic

⁴ Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany, Třeboň, Czech Republic

⁵ Academy of Sciences of the Czech Republic, Hydrobiological Institute, České Budějovice, Czech Republic

Abstract: We describe phenotype characters of cyanobacterial populations, dominating in the Tabocas reservoir, State of Pernambuco, Brazil, in the period February-June 1996. Massive development of cyanoprokaryotic species in the reservoir was then responsible for cyanotoxin production into the water. As a consequence, over 50 people died after intoxication by cyanotoxins in the hemodialysis center in Caruaru, Brazil. All the dominating cyanobacterial species from Tabocas reservoir belong exclusively to the tropical, not well known species. The basic phenotype descriptions and ecological characters of *Aphanothece stratus*, *Romeria caruaru* (spec. nova), *Aphanocapsa* cf. *cumulus*, *Microcystis protocystis*, *M. panniformis*, *Chroococcidiopsis* cf. *indica* and *Aphanizomenon manguinii* are included in the article. - Two important conclusions can be drawn from our results: (i) Numerous important specific and little known cyanobacterial types occur in tropical regions, different from these ones known from temperate zones, and (ii) the "picoplanktic" populations can be formed by cells liberated from macroscopic colonies of benthic and periphytic species. Our results support also the hypothesis about the toxicity of cyanobacteria from various taxonomic groups and various biotopes, and urge further study of the natural populations from little known tropical biotopes by combined traditional and modern molecular methods.

Key words: Cyanobacteria, Cyanophytes, taxonomy, ecology, plankton, toxicity, tropical regions, Brazil.

Introduction

From February 17th to May 26th, 1996, 116 of 130 patients (89%) experienced visual disturbances, nausea and vomiting following routine treatment at a hemodialysis center in Caruaru city, State of Pernambuco, Brazil. As of August 4th, fifty-five of the patients died having a common syndrome associated with liver hemorrhage or liver failure: Microcystins (hepatotoxins produced by cyanobacteria) were detected in water from Taboças reservoir from which the water for the town Caruaru (and for the dialysis center) was supplied, and in serum and liver tissues of case patients. The intoxication by microcystin was found to be responsible for this tragedy (SANTA CRUZ & FERNANDES 1996, JOCHIMSEN & al. 1998).

Toxins produced by cyanobacterial water blooms in eutrophized reservoirs and ponds (CARMICHAEL 1992, 1997, CODD 1995) could not be dangerous in simple contact with skin of people and animals, and can cause only allergies and minor intoxications. However, under special conditions, they can lead to death if they are accumulated in drinking water for warm-blooded animals, and then, of course, become to be dangerous for men in water supplies for human communities, as was just the case of Caruaru (CARMICHAEL & FALCONER 1993, CODD 1995, and others). For this reason, many projects, symposia and studies have been focused on cyanotoxins recently. The importance of this subject in Brazil follows from numerous studies concerning the trophic level and development of cyanobacterial water-blooms in Brazilian reservoirs (AZEVEDO & al. 1994, HUSZAR & al. 1998, NASCIMENTO & al. 1998, DOMINGOS & al. 1999, SILVA & al. 2001 etc.). The toxicity among almost all ecological groups of cyanobacteria was already detected (CODD 1995). However, the data about facultative (or permanent) toxicity or non-toxicity in various populations and species are still not satisfactory. The poor knowledge of cyanobacterial diversity in nature is complicating factor in this research.

The wide diversity and ecological specificities of cyanobacteria were proved. In spite of morphological simplicity and similarity, the cyanoprokaryotic phenotypic taxonomic units ("species") are not ubiquitous and do not have cosmopolitan distribution; the cyanoprokaryotic diversity from tropical regions is particularly insufficiently known. The correct identification of field samples from various biotopes is difficult and its importance underestimated, and lot of various concepts and arbitrary used names cause the misleading ideas about ecology, ecophysiology and distribution of various cyanobacterial types.

Therefore, the taxonomic evaluation of cyanobacterial samples and strains from Taboças reservoir was complicated. Moreover, the samples were collected and cultures were isolated with a certain delay, so that they do not correspond exactly with cyanobacterial community from the time of tragedy. The *Microcystis*- and *Aphanizomenon*-types were recognized in the first samples, but their identification on the species level was difficult in both cases. Toxicity of the morphologically similar *Microcystis flos-aquae* (from temperate zone) is not known with certainty; the best known *Aphanizomenon*-species (*A. flos-aquae*) is ecologically and geographically delimited in temperate zones, and was never found with certainty in tropical countries. Interesting strains containing the "picoplanktic" solitary cells (about 1 μ m

in diameter) and mucilaginous colonies with cells of the similar type were isolated, but their identification with known species was impossible.

In spite of problems with evaluation of taxa within cyanobacteria, the identification of field samples according to traditional phenotype characters is important for the toxicological studies. The cytomorphological evaluation of cyanoprokaryotic taxa, found in samples and strains from Tabocas reservoir near Caruaru, is therefore the content of this article.

Methods

All natural samples from the Tabocas reservoir were collected in the sub-surface. In 1996, the sampling was done from March until May. In 1997, a scientific project aims to study limnological characteristic of the reservoir, and relationship with cyanobacteria dominance was started (NASCIMENTO & al. 1998); since then phytoplankton samples were collected fortnightly.

Tabocas reservoir is located approximately 40 km from Caruaru (08°06'15''S; 36°13'23''W). The dam was built in 1969 to retain water for irrigation and drinking purposes. Its direct catchment area covers a surface of 384 km² and the maximum capacity is 13.6 x 10⁶ m³ (theoretical volume). At this optimal capacity, the maximum depth is 23m in front of the dam. A dry season lasts from August to February in this region, with precipitation average of 407 mm. This region is semi-arid with temperatures over 18° year-round.

The analyses of phytoplankton before 1996 performed by Water Treatment Company from Pernambuco State (COMPESA) showed that cyanobacteria were dominant in the reservoir since 1990 with *Microcystis*, *Anabaena* and *Cylindrospermopsis* identified as the most common genera (NASCIMENTO & al. 1998).

The following samples were studied by light microscopy:

- (1) Nine natural samples collected in March and May 1996, preserved by Lugol solution. Ten additional samples, containing planktic populations from years 1997 and 1998 were available.
- (2) Cultures of natural samples collected during 1996, containing mixtures of several types (species).
- (3) 41 more or less monospecific (but not bacteria-free) strains, isolated from natural samples.

According to the observations of first natural samples under optical microscope, three basic cyanoprokaryotic types occurred abundantly: one filamentous *Aphanizomenon*-species, two *Microcystis*-species and small-celled morphotypes with cells about 1 µm in diameter. Unfortunately, only one type of *Microcystis* and "picoplanktic" strains were isolated in culture. Cultivation was performed in liquid cultures using ASM-1 medium (GORHAM & al. 1964), at 23° C with a photoperiod of

12h and 45 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The isolated strains were studied by electron microscopy as described in KOMÁREK & CEPÁK (1998).

From the small-celled colonial strains containing three-different morphotypes (colonies of the *Aphanothece*-, *Aphanocapsa*- and *Romeria*-types) two morphological deviations with rod-like cells were selected for sequencing to prove their taxonomic relationships. For comparison, one phenotypically distinctly different strain of *Chroococcidiopsis* was used. For 16S rDNA sequencing, cultures of monospecific isolates were harvested by centrifugation and genomic DNA was isolated by phenol extraction, chloroform extraction and sodium acetate/ethanol precipitation. The almost complete 16S rDNA from the genomic DNA was amplified by PCR by *Pfi* DNA polymerase using primers corresponding to nucleotides 8-27 of the RNA-like strand and 1458-1437 of the complementary strand of *Synechococcus* PCC 6301 (TOMIOKA & SUGIURA 1983). The PCR product was directly cloned into pGATA positive selection vector (Takara) and transformed into *E. coli* strain DH5 α . Sequencing of plasmid DNA was carried on ABI PRISM 310 sequencer (Perkin-Elmer). Sequence comparisons were made with the help of the RDP database (MAIDAK & al. 2000).

Results and discussion

The samples from the Tabocas reservoir contained rich community of planktic microflora, characteristic for freshwater tropical, eutrophic water bodies, in which numerous coccal green algae, mainly from the genera *Ankistrodesmus*, *Coelastrum*, *Monoraphidium*, *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Tetraedron*, etc. were commonly present, accompanied by several Diatom species (e.g., from the genus *Nitzschia*). Cyanobacteria were another dominant group in phytoplankton. We do not have the data about abundancy of various species from the critical time of the Caruaru tragedy, but the cyanobacteria were commonly present in later samples, and their tendency to form water blooms was evident.

Seventeen cyanoprokaryotic morphotypes ("species" in traditional sense) were recognized according to the phenotype features (Table 1), from which six appeared in higher biomass: *Aphanocapsa* cf. *cumulus*, *Aphanothece* cf. *stratus*, *Leptolyngbya* sp., *Microcystis* *protocystis*, *M. panniformis* and *Pseudanabaena* cf. *galeata*. The tropical *Aphanizomenon manguinii* was condominant among water bloom forming species. Later, characteristic strain of *Synechococcus* sp. appeared in cultures, which could be, however, a contaminant.

The common presence of two picoplanktic cyanobacteria (with spherical and rod-like cells) was remarkable. However, cultivation of strains indicated that these solitary cells were liberated from massive benthic mucilaginous colonies, corresponding morphologically well to the genera *Aphanothece* and, possibly, *Aphanocapsa*, namely to *Aphanothece stratus* and *Aphanocapsa cumulus* recently discovered by KOMÁREK & CRONBERG (2001) from Botswana, southern Africa. The name of *Aphanocapsa cumulus* was used originally for the identification of all picoplanktic specimens from Tabocas reservoir (comp. DOMINGOS & al. 1999). Picoplanktic cyanobacteria are usually considered to be unicellular types of the

genera *Cyanobium*, *Synechococcus* and *Synechocystis* (KOMÁREK 1999). Typical picoplanktic species from these genera surely exist, but obviously some distinct freshwater picoplankters from Tabocas reservoir were liberated cells from colonies (and regular growth stages) of benthic and periphytic-cyanobacteria living primarily in mucilaginous colonies.

Comments to studied species:

(1) "Picoplanktic species" (*Aphanothece stratus*, *Aphanocapsa* cf. *cumulus*, *Romeria caruaru* spec. nova)

In phytoplankton samples (unfiltered water) two types of picoplanktic cells were found: fine rods with cells 0.8-1.5 x 0.4-0.6 μm , and spheres about 0.5-1.0 μm in diameter. Similar cells were found in mucilaginous colonies from benthic samples. The solitary cells corresponded to the genera *Cyanobium* and *Synechocystis* respectively, and were originally identified, together with benthic colonies, by KOMÁREK [in litt.] as "*Aphanocapsa cumulus* + solitary living spherical cells". This designation was used also in the first study about the Caruaru picoplanktic cyanobacteria (DOMINGOS & al. 1999).

It was recognised, that in cultures the most common clones belonged to the "*Cyanobium*-type" with very short rod-like to oval cells. This type occurred frequently in five natural samples and was isolated in 12 subcultures. Solitary cells were rarely agglomerated into small mucilaginous clusters with several, loosely dispersed cells, enveloped by fine, colorless and diffuse slime. In older cultures (especially at the stationary phase of growth), the fine macroscopic, mucilaginous colonies of irregular shape, to 2 cm in diameter, appeared on the bottom of cultivation vessels, resembling the colonies of *Aphanothece* (subg. *Anathece*) *stratus*. The size, morphology and ultrastructure of cells were the same in solitary cells and within colonies (Fig. 1).

Apparently, the solitary picoplanktic "*Cyanobium*" cells (rod-like) and colonial "*Aphanothece*-type" represent the same genotype with a complicated life cycle (Fig. 2), in which both morphotypes, unicellular and colonial, can regularly occur dependent on the environmental factors. As the morphologically and ecologically almost identical species is *Aphanothece stratus*, recently described from southern Africa, Botswana, with rod-like cells 0.6-2.0 x 0.5-0.8 μm , we designate this species by this name. The corresponding strain is in culture collection (CCALA, Třeboň). Several similar, very fine species known mainly from temperate zone (*A. minutissima*, *A. bachmannii*, *A. clathrata*) live exclusively planktic in small colonies in mesotrophic lakes and ponds, the benthic and occasionally planktic *A. nebulosa* is known only from cold and oligotrophic northern lakes of Scandinavia. *Aphanothece stratus* is evidently a tropical, colonial species, living benthic in shallow reservoirs, in which solitary *Cyanobium*-like cells can release and live periodically picoplanktic in tropical water bodies. The population from Tabocas reservoir was studied in 12 subcultures.

Cytomorphologically slightly different species from *Aphanothece stratus*, forming short, wavy and irregular rows (filamentous formations) of elongated, slightly coiled cells, was found in our picoplanktic cultures (Fig. 3). This strain has very similar internal structure of cells like *Aphanothece* (Fig. 4), and it is different only a little by cell size, but distinctly by life cycle from *Aphanothece* cf. *stratus* (Fig.

2). Its solitary cells were hardly distinguishable from liberated picoplanktic unicells of *Aphanothece* cf. *stratus*. The possible genetic identity with *Aphanothece* was therefore also possible. The partial 16S rDNA sequencing indicated that these strains are really closely related, but not identical (Table 2), with the difference corresponding more or less with that between other cyanobacterial morphotypes (often considered as traditional species and/or genera). Therefore, the morphotype forming pseudofilamentous formations in the life cycle is described as a new species, *Romeria caruaru* spec. nova¹ (Figs 3-4). However, both strains clearly belong to the *Prochlorococcus marinus*/marine *Synechococcus* cluster ("branch A" by WILMOTTE 1994).

¹ **Diagnosis:** *Romeria caruaru* spec. nova - *Cellulae solitariae vel in trichoma curta; trichoma libere natantia, brevissima, 1-4(12)-cellularia, contorta, evaginata, ad dissepimenta paucim constricta, solitaria vel in aggregationibus mucilaginosi libere implexa; cellulae cylindricae, 1-12,8 x 0,7-1,0 μm, apicibus rotundatis, contentu pallide aerugineo, homogenero, irregulariter conjunctae; mucilago homogenera, incolora, diffluens. Thylakoidae (2)3(4), parietales. - Habitatio: Planktice in stagno eutrophico artificiali prope oppido Caruaru, Brasilia orientalis (locus classicus). - Typus: specimen no. ... (BRNM-HY 1201); icona typica: figura nostra 3.*

Another cyanobacterium with similar size of cells, which were, however, of spherical shape and about 1 μm in diameter, was abundant in other four samples and in two cultures (Fig. 5). This type formed large and irregular macroscopic colonies with very densely aggregated cells in colorless slime, up to more than 2 cm in diameter. The colonies were dark green, yellowish green or blue-green. This type with spherical cells resembles morphologically closely another species described recently (*Aphanocapsa cumulus* KOMÁREK & CRONBERG 2001) from benthos of swampy littoral of ponds in Botswana, southern Africa. Spherical picoplanktic solitary cells were found together with *Aphanocapsa* colonies in two cultures, from which follows, that they also liberated from *Aphanocapsa* colonies.

To summarize, the both rod-like and spherical picoplanktic cells from Tabocas reservoir do not represent themselves special species, but they are only the stages of benthic, colonial cyanobacteria. The solitary "Cyanobium-like" or "Synechocystis-like" cells can be released occasionally into the water from some benthic, cyanobacterial, colonial species, and have in this case a function of picoplanktic cyanobacteria (Fig. 4). From our two types, one with spherical cells resembles the cells of the colonial *Aphanocapsa cumulus* known originally from Botswana. The second type, corresponding to the *Aphanothece* (subg. *Anathece*) and joined in the paper of DOMINGOS & al. (1999) with *Aphanocapsa cumulus*, corresponds phenotypically and by morphology of colonies to another species, *Aphanothece stratus*. The genotype resemblance of both mentioned types must be proved in future. The newly defined *Romeria caruaru* has rather the nanoplanktic type of life, and must be defined as a special phenotype species different distinctly from *Aphanothece*, with similar rod-like cells, which join, however, into pseudofilamentous formations.

There is little known about toxicity of picoplanktic, nanoplanktic and small-celled colonial cyanobacteria. Distinct cytotoxic and immunotoxic effects in several

picoplanktic strains were detected by BLÁHA & MARŠÁLEK (1999). The potential toxin production of *Aphanocapsa* cf. *cumulus* from Tabocas reservoir is discussed by DOMINGOS & al. (1999). The responsibility of common fine *Aphanocapsa*, *Aphanothece* and *Romeria* populations for intoxication of Caruaru water is therefore very probable.

(2) *Microcystis protocystis* and *M. panniformis*

Two *Microcystis* morphotypes were found in natural samples from Caruaru reservoir, distinctly different from populations known from temperate zones. Morphology of the genus *Microcystis* is very simple with wide infraspecific variation (KONDRATEVA 1968, KATO & al. 1991), and the up to date molecular analyses indicated genotype uniformity within this genus, so that species identification is rather difficult. However, characteristic form of colonies, cell size and life cycle are different and recognisable in numerous natural *Microcystis* populations, and used for their identification. Their phenotype taxonomy is important for investigations of toxic effect of various *Microcystis* populations and can not be underestimated.

The Brazilian *Microcystis* populations are intensely studied during past years. The specimens from Caruaru were found identical with two species, recently characterized by KOMÁREK & al. (2001) from São Paulo State, and identified as *M. protocystis* CROW 1923 and *M. panniformis* KOM. et al. 2001. Both these species are probably common pantropical species, forming often heavy water blooms. Particularly *M. protocystis* is known from reservoirs of the whole tropical zone. There are indications of a strong toxicity of both mentioned species strains (M.T.P. AZEVEDO, in litt.). Both species deserve therefore further study for their ecological and sanitary importance.

The cell structure of both species *M. protocystis* and *M. panniformis* was investigated from strains isolated by P. DOMINGOS and M.T.P. AZEVEDO respectively (comp. in KOMÁREK & al. 2001). Both species were surely found and mentioned in literature several times, but probably misinterpreted with *M. aeruginosa* (young stages of *M. protocystis* and *M. aeruginosa* are particularly similar). *M. panniformis* with smaller and densely agglomerated cells was usually designated as *M. flos-aquae* (this species is similar, but with different life cycle, with slightly larger cells, and occurs probably only in temperate zones). However, the most similar is toxic *M. ichthyoblabe*, known mainly from temperate zones. Similar species is also tropical *M. lamelliformis*, described from Sri Lanka by HOLSINGER in 1954 (ROTT 1983). The type material of this species does not exist, and we did not found identical types in recent samples from lakes from Sri Lanka, which we have at disposal. Another specimens exist there, that better correspond to the original HOLSINGER's description of *M. lamelliformis*.

M. protocystis (Fig. 6) is characteristic particularly by the obligatory sparsely and irregularly arranged cells in very diffuse, homogeneous, colorless slime over the whole vegetation period, and with cells 3.5-7.2 µm in diameter (under suboptimal culture conditions are the mother cells up to 8.5 µm in diameter). Colonies are irregular in outline and easily disintegrate to small clusters of cells. Clathrate colonies

with densely aggregated cells were never observed. For ultrastructure of the strain isolated from Tabocas reservoir see KOMÁREK & al. (2001).

M. panniformis (Fig. 7) has more complicated life cycle (see KOMÁREK & al. 2001) and evenly, densely arranged cells, mainly in surface layers of colonies. Cells are 2.8-4.8 μm in diameter, the mucilage does not overlap the cell agglomerations.

(3) *Chroococidiopsis* cf. *indica*.

Our population of *Chroococidiopsis* is not planktic and was not detected in natural samples, but it appeared commonly in cultures, and was isolated in one monospecific strain (Fig. 8). The toxicity of this strain is unknown. The strain corresponded phenotypically and ecologically mostly to *Chroococidiopsis indica* DESİK. 1959, described from India, but the proof of identity is problematic. The 16S rDNA sequencing indicated close genotype relationship to *Chroococidiopsis* sp. PCC 7203 (Table 3). It corresponds phenotypically also to the type-species of this genus, *C. thermalis* (see KOMÁREK & HINDÁK 1975, strain GREIFSWALD/149) with different ecology, and commonly to the genus *Chroococidiopsis*. *Chroococidiopsis* strains are related also to coccoid, non-baeocytic *Cyanothece*, to other baeocytic species, but also to cluster of nostocalean strains, although the mentioned coccoid morphospecies are aheterocytous (Table 3). Interestingly, all these types have similar type of thylakoidal patterns within cells. Their phenotype identification on the modern generic level (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998) is without doubts and fully in coincidence with up to date molecular sequencing.

Description of population from our isolated strain (Fig. 8): Cells solitary or in microscopic to macroscopic irregular aggregations, irregular spheroidal to spherical, 1.8-7.2 μm in diameter, enveloped by thick, firm, colorless sheaths tightly enveloping cells and clusters of young cells. Cell content slightly granular, olive-green. Thylakoids coiled, not fasciculated, but densely clustered and irregularly spread over the cell volume, mainly near the periphery. Reproduction by irregular cell division in various planes, which sometimes repeat within the sheath (baeocytes). The sheaths develop around the baeocytes already during the division and become thicker during growth. They are composed from two main distinct layers in old cells: from the inner thicker of layered and filamentous material, and outer homogeneous, electron dense. Daughter cells liberate from sheaths after their rupture.

(4) *Aphanizomenon manguinii*

Aphanizomenon manguinii BOURR. in BOURR. et MANGUIN 1952 was a condominant, water-bloom forming cyanobacterium in natural samples from the Tabocas reservoir. This characteristic freshwater or slightly brackish species was originally described from Guadeloupe (BOURRELLY & MANGUIN 1952); now is known only from several other localities in tropical America (Brazil, Cuba, Mexico; KOMÁREK 1984). The population from Tabocas reservoir had several morphological specificities in comparison with other populations (particularly morphology of trichome ends). It grows in solitary trichomes and sometimes forms slight water blooms. This species

was not yet isolated in culture, and nothing is known about its toxicity, ultrastructure and detailed ecology. It is difficult to estimate, whether *A. manguinii* participated to the toxin production in Tabocas reservoir.

A. manguinii belongs to few tropical *Aphanizomenon*-species living in solitary trichomes with terminal cells morphologically different from vegetative cells and rounded at the apex, but not intensely elongated. The majority of *Aphanizomenon* species has delimited areas of distribution in dependence on the ecological demands. It concerns also the best known *A. flos-aquae*, which grows in fascicles and its distribution is restricted to temperate zones.

Description of our population (Fig. 9): Trichomes solitary, free floating, almost straight or slightly irregularly curved, in the middle 5-5.6 μm wide, slightly constricted at cross walls, at the ends sometimes not constricted. Cells cylindrical to very slightly barrel-shaped, with pale greyish blue-green content, often with scattered, distinct granules and probably facultative aerotopes (but parts of trichomes are very pale, without any granulation), (5)6-8.5 μm long, towards ends narrower, sometimes hyaline and up to 14.5 μm long; apical cells cylindrical or slightly barrel-shaped and rounded at the end. Heterocytes solitary, intercalar, usually 1-2, rarely up to 6 in one filament, more or less rounded in outline or slightly elongated, with hyaline content, 5.6-8.5 x 5.2-6.8 μm . Akinetes solitary or (less frequently) in pairs, intercalar, separated from heterocytes, oval or ellipsoidal in outline, later to almost spherical, with smooth, yellowish-brown exospore, with granular content, 11.8-15.9 μm in diameter.

(5) Accessoric species

One *Synechococcus* morphotype and species with fine filaments (especially *Leptolyngbya* sp. and *Pseudanabaena* sp.) occurred in numerous subcultures from Tabocas reservoir. They were never found in distinct populations in planktic samples from the reservoir, probably occur mostly in littoral and benthic algal communities. There is nothing known about their toxicity. However, in spite of it, they can participate on the production of cyanotoxins into the water. Their role in reservoirs is generally very little known.

Almost all populations from Tabocas reservoir were phenotypically slightly different from currently defined corresponding species, and their detailed taxonomic evaluation is open.

Acknowledgments

Samples from Sri Lanka were kindly provided by Prof. Dr. Eugen ROTT, Innsbruck, Austria (ROTT 1983). We thank Ing. Jana NEBESÁROVÁ CSc. and Dr. Josef SULEK CSc. for their help with electron microscopy. - The studies in laboratories of the Institute of Botany (Czech Academy of Sciences) and Faculty of Biological Sciences (University of South Bohemia), Czech Republic, were supported by the Grant Agency of the Czech Academy of Sciences (reg. no. A6005704, to 1998), and GA CR no. 206/98/1536.

References

- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, W. (1994): First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. - J. Appl. Phycology 6: 261-265.
- BLÁHA, L. & MARŠÁLEK, B. (1999): Microcystin production and toxicity of picocyanobacteria as a risk factor for drinking water treatment plants. - Arch. Hydrobiol./Algolog. Studies 92: 95-108.
- BOURRELLY, P. & MANGUIN, E. (1952): Algues d'eau douce de la Guadeloupe et dépendances. - 282 pp., Paris.
- CARMICHAEL, W.W. (1992): A Review: Cyanobacterial secondary metabolites - the cyanotoxins. - Appl. Bacteriol. 72: 445-459.
- CARMICHAEL, W.W. (1997): The Cyanotoxins. - Advances Bot. Res. 27: 211-226.
- CARMICHAEL, W.W. & FALCONER, I.R. (1993): Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. - In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water, p. 187-209, Academic Press, New York.
- CODD, G.A. (1995): Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. - Wat. Sci. Tech. 32: 149-156.
- CROW, W.B. (1923): The taxonomy and variation of the genus *Microcystis* in Ceylon. - New Phytol. 22(2): 59-68.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O. & CARMICHAEL, W.W. (1999): First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply. - Environm. Toxicology 14(1): 31-35.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.R.; HAMMER, V.T. & KIM, W.K. (1964): Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (LYNGB.)BRÉB. - Verh. ind. Ver. Limnol. 15: 796-804.
- HUSZAR, V.; SILVA, L.; DOMINGOS, P.; MARINHO, M. & MELO, S. (1998): Phytoplankton communities of tropical lakes with different trophic levels. - Hydrobiologia 369/370: 59-71.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, B.C.; DE MELO Filho, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETTO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O. & JARVIS, W.R. (1998): Liver failure and death after exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. - The New England J. Med. 338: 873-878.
- KATO, T.; WATANABE, M.F. & WATANABE, M. (1991): Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic interference. - Arch. Hydrobiol./Algolog. Studies 64: 129-140.
- KOMÁREK, J. (1984): Sobre las cianofíceas de Cuba: (3) Especies planctónicas que forman florecimientos de las aguas. - Acta bot. cubana 19: 1-33.
- KOMÁREK, J. (1999): Intergeneric characters in unicellular cyanobacteria, living in solitary cells. - Arch. Hydrobiol./Algolog. Studies 94: 195-205.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1998): Cyanoprokaryota, 1. Teil Chroococcales. - In Ettl, H. & al. ed., Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, 548 pp., Gustav Fischer, Jena.
- KOMÁREK, J. & CEPÁK, V. (1998): Cytomorphological characters supporting the taxonomic validity of *Cyanothece*. - Plant Syst. Evol. 210: 25-39.

- KOMÁREK, J. & CRONBERG, G. (2001): Some chroococcalean and oscillatoriacean Cyanoprokaryotes from southern African lakes, ponds and pools. - Nova Hedwigia, in press.
- KOMÁREK, J. & HINDÁK, F. (1975): Taxonomy of the new isolated strains of *Chroococciopsis* (Cyanophyceae). - Arch. Hydrobiol./Algolog. Studies 13: 311-329.
- KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. & SENNA, P.A.C. (2001): Two common *Microcystis* species from tropical America - Cryptogamie/Algologie, in press.
- KONDRATEVA, N.V. (1968): Voprosy morfologii i sistematiki *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenk. i blizkich k nemu vidov. [Problem of morphology and systematics of *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenk. and related species.] - In: "Cvetenie vody", p. 13-42, Kiev.
- MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, C.T. JR.; SAXMAN, P.R.; STREDWICK, J.M.; GARRITY, G.M.; LI, B.; OLSEN, G.J.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M. & TIEDJE, J.M. (2000): The RDP (Ribosomal Database Project) continues. - Nucleic Acids Res. 28:173-174
- NASCIMENTO, S.M.; MOLICA, R.J.R.; OLIVEIRA, S.; SILVA, L.H.S. & OLIVEIRA, A.C.P. (1998): Cyanobacteria dominance and toxicity in Tabocas reservoir, Caruaru - Brazil. - In: Abstr. 4th Internat. Conf. Toxic. Cyanobacteria, Beaufort - NC, USA, p. 98.
- ROTT, E. (1983): A contribution to the phytoplankton species composition of Parakrama Samudra, an ancient man-made lake in Sri Lanka. - In: SCHIEMER, F. ed., Limnology of Parakrama Samudra - Sri Lanka. A case study of an ancient man-made lake in the tropics, 236 pp.
- SANTA CRUZ, A. & FERNANDES, M. (1996): As mortes silenciosas - O veneno das águas - O lar dos amarelos. - Veja, 5.6.1996, p. 36-53.
- SILVA, L.; HUSZAR, V.; SANT'ANNA, C.; DOMINGOS, P. & MARINHO, M. (2001): Regulation of cyanoprokaryotic assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. - Hydrobiologia, in press.
- TOMIOKA, N. & SUGIURA, M. (1983): The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. - Mol. Gen. Genet. 191: 46-50.
- WILMOTTE, A. (1994): Molecular evolution and taxonomy of the Cyanobacteria. - In: BRYANT, D.A. ed., The molecular biology of cyanobacteria. p. 1-25, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Authors' addresses:

Prof. Dr. Jiří Komárek,
University of South Bohemia,
Faculty of Biological Sciences,
Branišovská 31,
CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

Prof. Dr. Sandra M.F.O. Azevedo, and Dr. Patricia Domingos,
Federal University of Rio de Janeiro,
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais,
21941-590 Rio de Janeiro, Brazil

Dr. Jaroslava Komárková,
Academy of Sciences of the Czech Republic,
Hydrobiological Institute,
Na sádkách 7,
CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic

Dr. Martin Tichý, PhD,
Academy of Sciences of the Czech Republic,
Institute of Microbiology,
Opatovický mlýn,
CZ-37981 Třeboň, Czech Republic

Description to figures:

Fig. 1 Fine sections of picoplanktic *Cyanobium*-like cells (A) and cells from colonies of *Aphanothece stratus* (B). Explanations: **t** = thylakoids, **cw** = cell wall, **c** = carboxysomes, **p** = polyphosphates.

Fig. 2 Scheme of the life cycle of *Aphanothece stratus*. - Orig.

Fig. 3 *Romeria caruaru* from cultures from Tabocas reservoir, solitary cells and short, irregular trichomes.

Fig. 4 *Romeria caruaru*, fine sections of cells from culture. Explanations as in Fig. 1.

Fig. 5 *Aphanocapsa* cf. *cumulus* from cultures from Tabocas reservoir.

Fig. 6 *Microcystis protocystis*; different form of colonies from field samples (Tabocas reservoir).

Fig. 7 *Microcystis panniformis*; **a-b** - colonies from São Paulo State; **c-e** - colonies from Tabocas reservoir (in figs. **c** and **d** are solitary, large cells of *Microcystis protocystis*).

Fig. 8 Morphology and fine structure of cells of *Chroococciopsis* cf. *indica*, isolated from Tabocas reservoir. - Orig.

Fig. 9 *Aphanizomenon* cf. *manguinii*; filaments from field samples in Tabocas reservoir; **a-b** - details of trichome ends; **c-h** - solitary filaments; **i** - detail of cells with aerotopes; **j** - development of akinetes; **k** - spherical, ripe akinete with detail of the cell wall. - Orig.

Table 1. List of cyanoprokaryotic types in the Tabocas reservoir.

Table 2. Pairwise similarities between 16S rDNA sequence (818 bp compared) of *Aphanothece stratus*, *Romeria caruaru* and related cyanobacterial strains.

Table 3. Pairwise similarities between 16S rDNA sequence (1389 bp compared) of *Chroococciopsis* cf. *indica* and most related filamentous, particularly heterocytous cyanobacterial strains.

Table 1.

**List of cyanoprokaryotic types in the Tabocas reservoir
(collected in 1996)**

Aphanocapsa cumulus KOM. et CRONB.*
picoplanktic small spheres, less than 1 μ m in diam. *
Aphanothece cf. *stratus* KOM. et CRONB *
picoplanktic rods (liberated from previous species) *
Aphanizomenon manguinii BOURR. forma *
Chroococidiopsis cf. *indica* DESIK. *
Jaaginema sp.
Leptolyngbya sp.
Microcystis panniformis KOM. et al.*
Microcystis protocystis CROW *
Oscillatoria - trichome fragments
Phormidium sp.
Pseudanabaena cf. *galeata* BÖCHER *
Pseudanabaena sp.
Rhabdogloea cf. *subtropica* HIND.
Romeria caruaru spec. nova *
Synechococcus sp. (long, cylindrical cells)

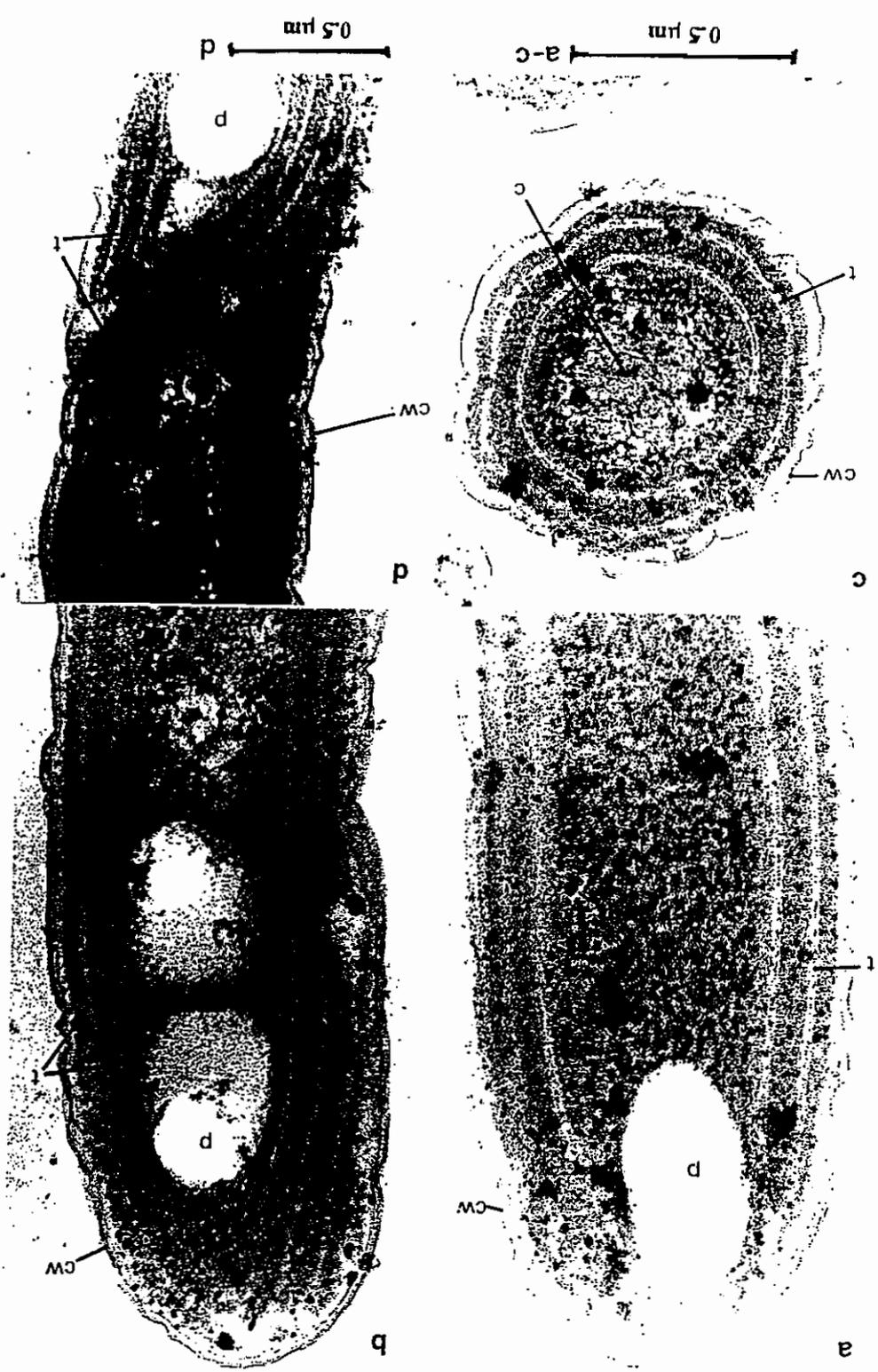
* = with comments in our text

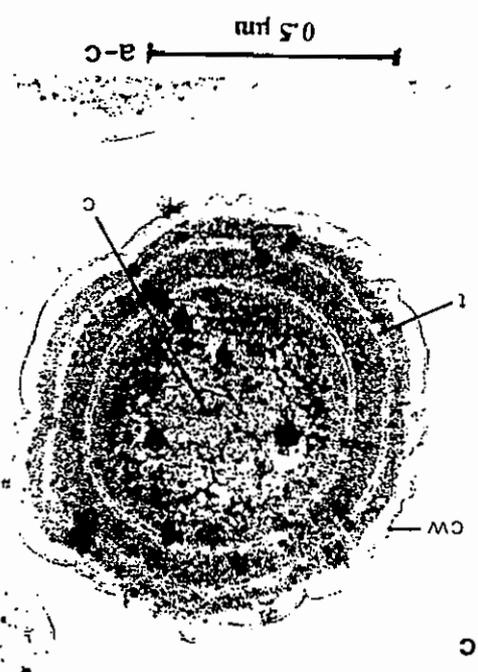
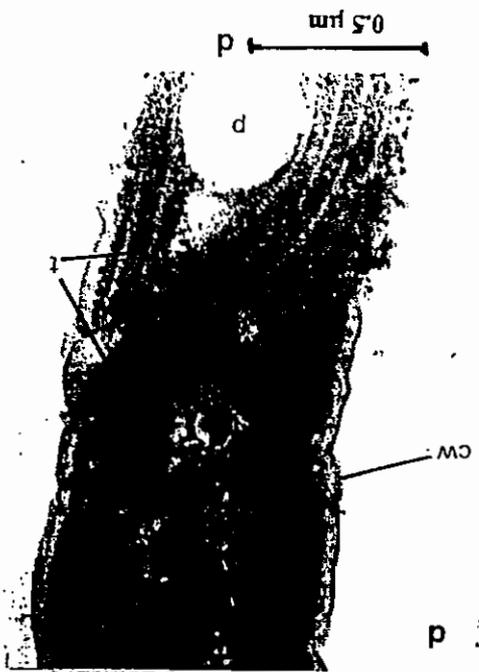
Table 2. Pairwise similarities between 16S rDNA sequence (818 bp compared) of *Aphanathece stratus*, *Romeria caruaru* and related cyanobacterial strains.

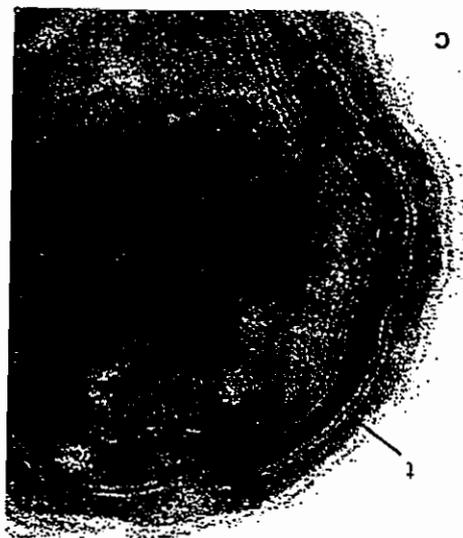
Strain	Pairwise similarity								
<i>Aphanathece stratus</i>									
<i>Romeria caruaru</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Synechococcus</i> PCC6307	.998	.998	.985	.967	.926	.922	.907	.786	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7001	1.00	.974	.974	.965	.915	.914	.893	.778	
<i>Prochlorococcus marinus</i> PCC 9511	.974	.965	.915	.914	.907	.897	.778		
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	.963	.911	.907	.887	.778				
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	.904	.903	.887	.778					
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	.997	.901	.784						
<i>Escherichia coli</i>	.898	.777							
	.766								

Table 3. Pairwise similarities between 16S rDNA sequence (1389 bp compared) of *Throcoocoidiopsis cf. indica* and most related filamentous, particularly heterocytous cyanobacterial strains.

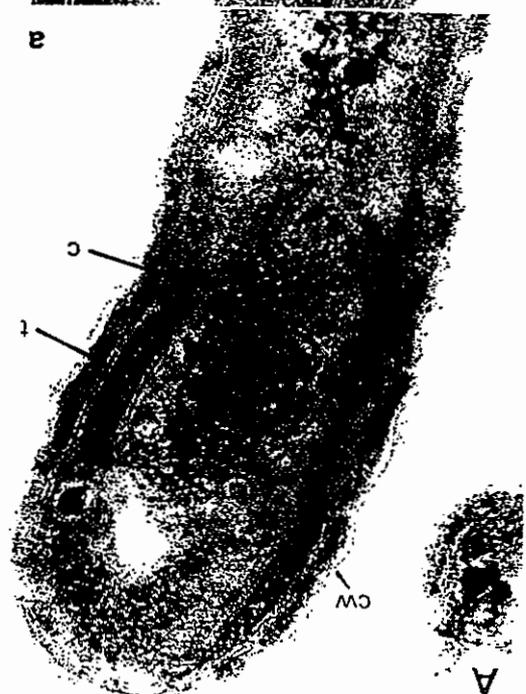
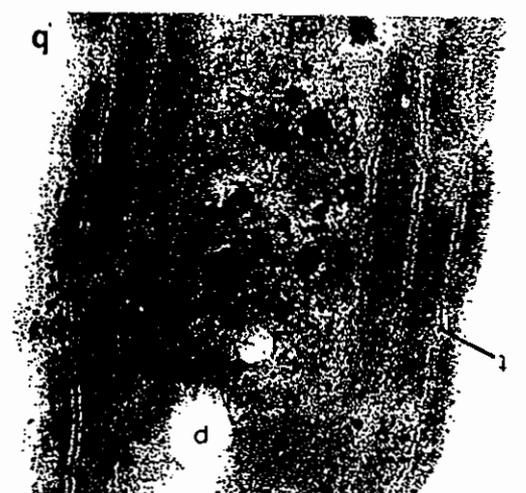
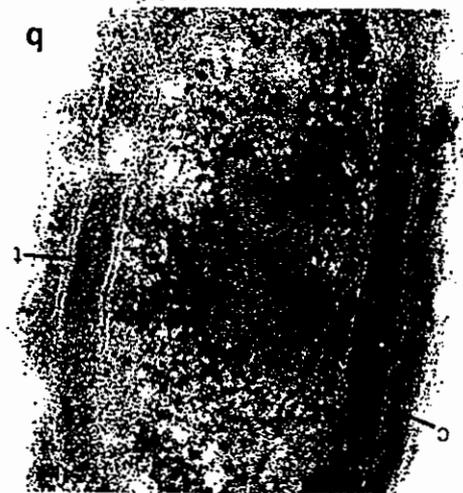
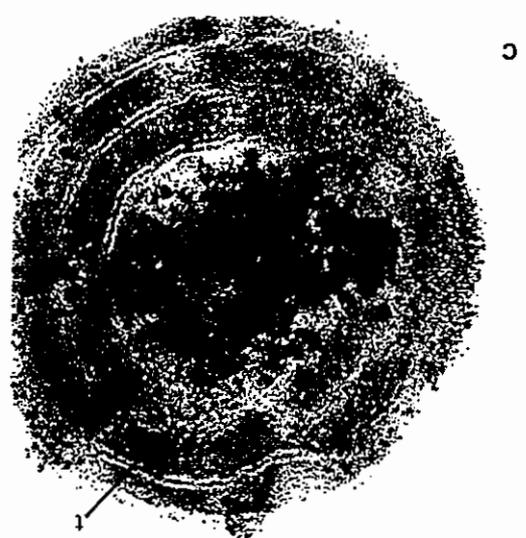
Strain	Pairwise similarity										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Throcoocoidiopsis cf. indica</i>											
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7203	.983										
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7420	.908	.905									
<i>Nostoc muscorum</i> PCC 7120	.909	.903	.904								
<i>Cylindrocapsa</i> sp. PCC 7417	.968	.909	.897	.897							
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	.949	.952	.898	.897	.896						
<i>Nodularia</i> BCNOD9427	.946	.940	.907	.903	.898	.898					
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	.939	.948	.907	.903	.899	.894	.894				
<i>Chamaesiphon subglobosus</i> PCC 7430	.892	.897	.907	.899	.899	.894	.892	.888			
<i>Trichodesmium contortum</i>	.900	.893	.905	.905	.907	.907	.890	.888	.755		
<i>Escherichia coli</i>	.744	.765	.770	.764	.760	.760	.761	.761	.750		





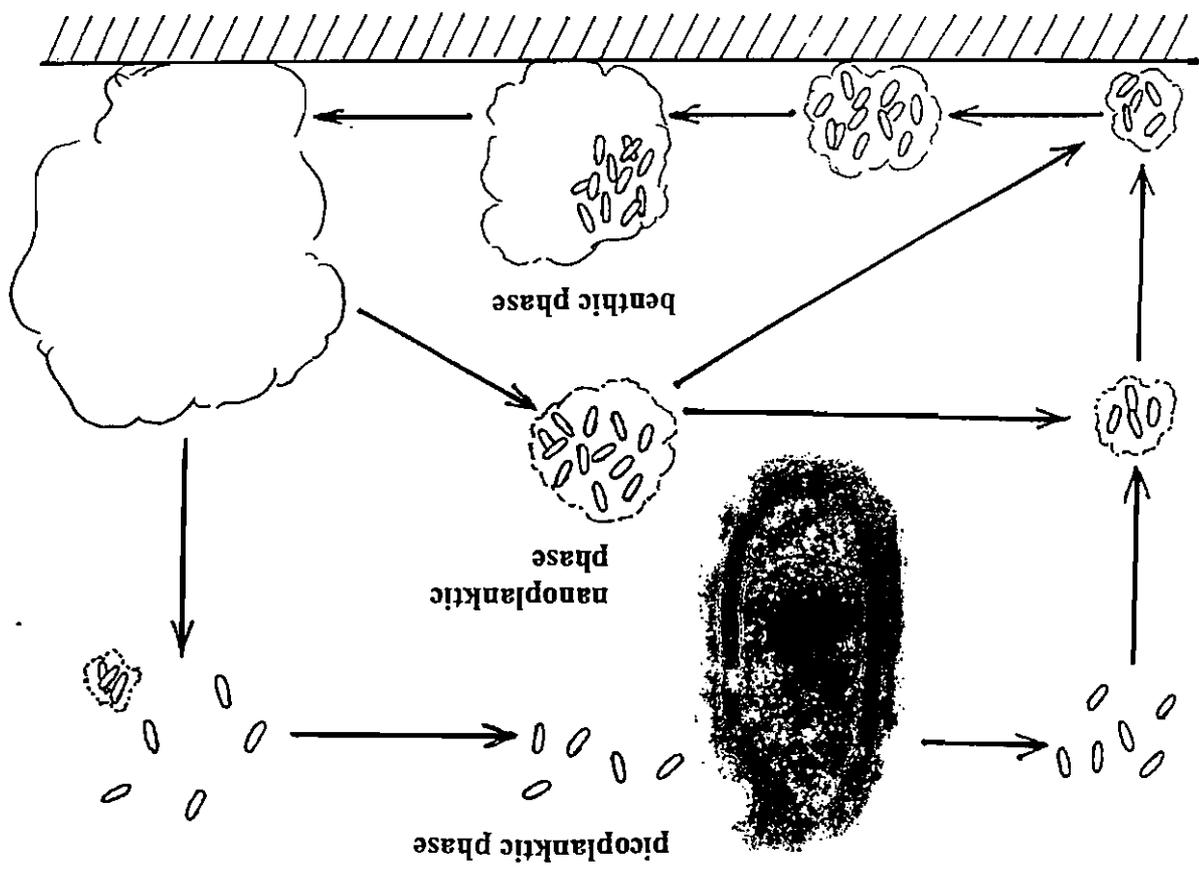


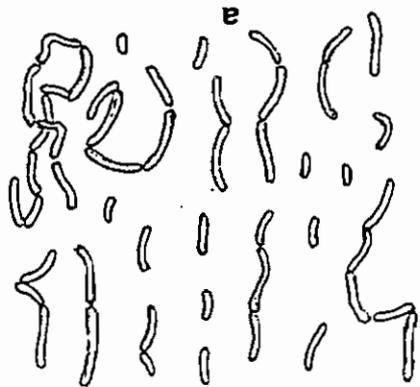
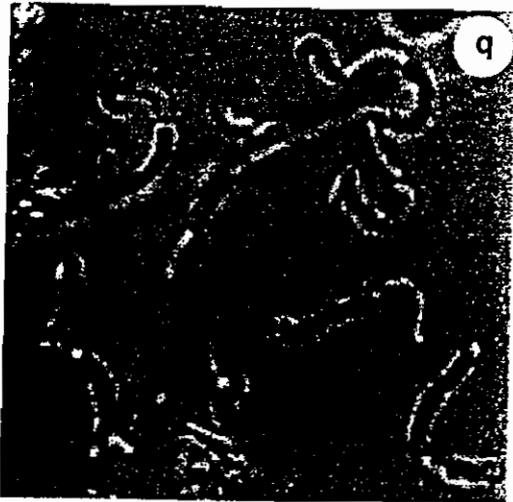
0.5 μ m

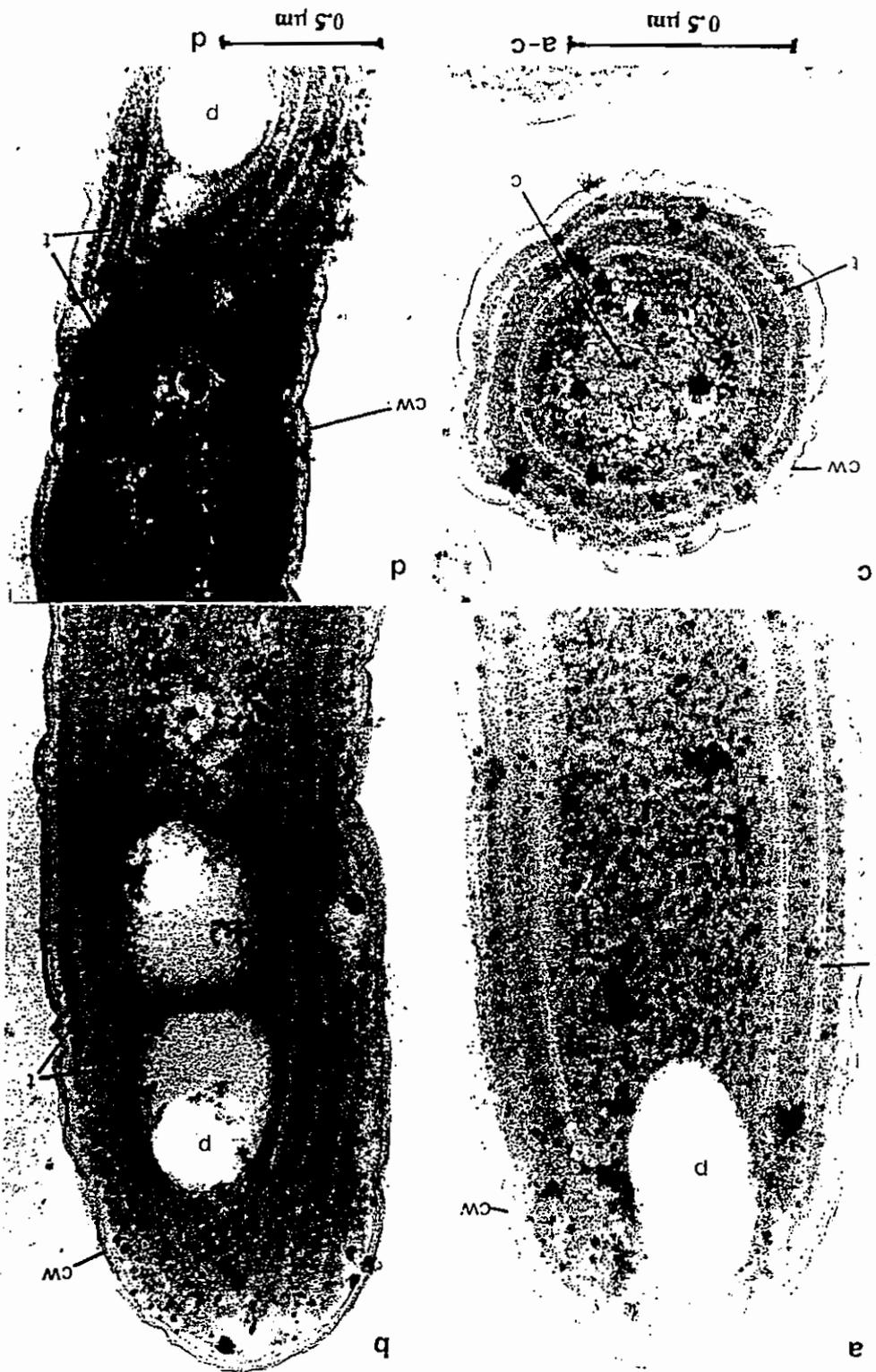


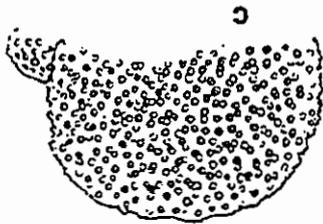
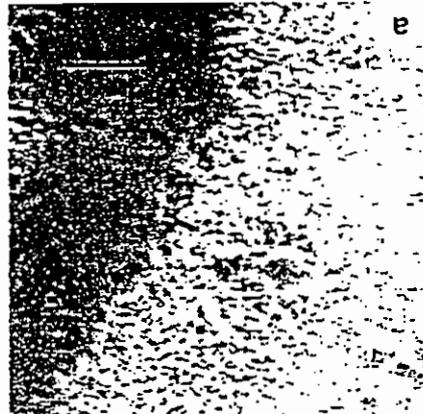
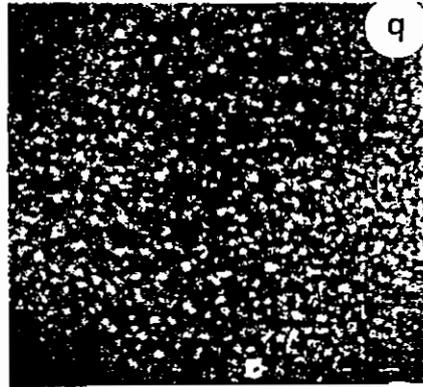
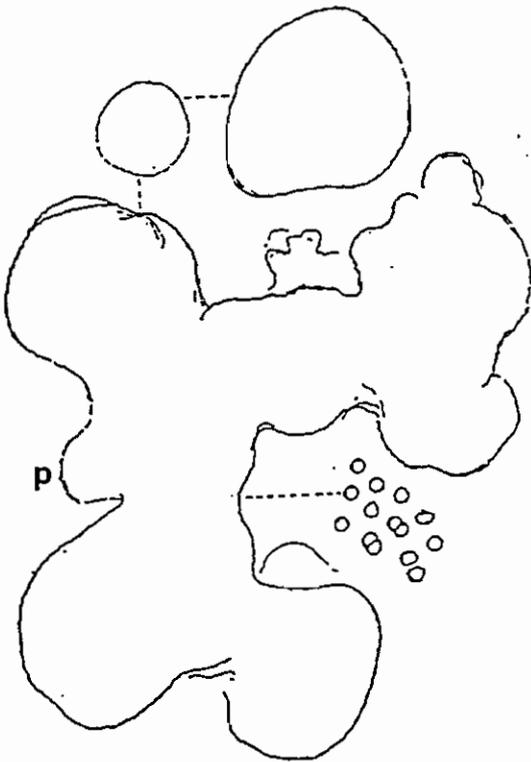
B

A

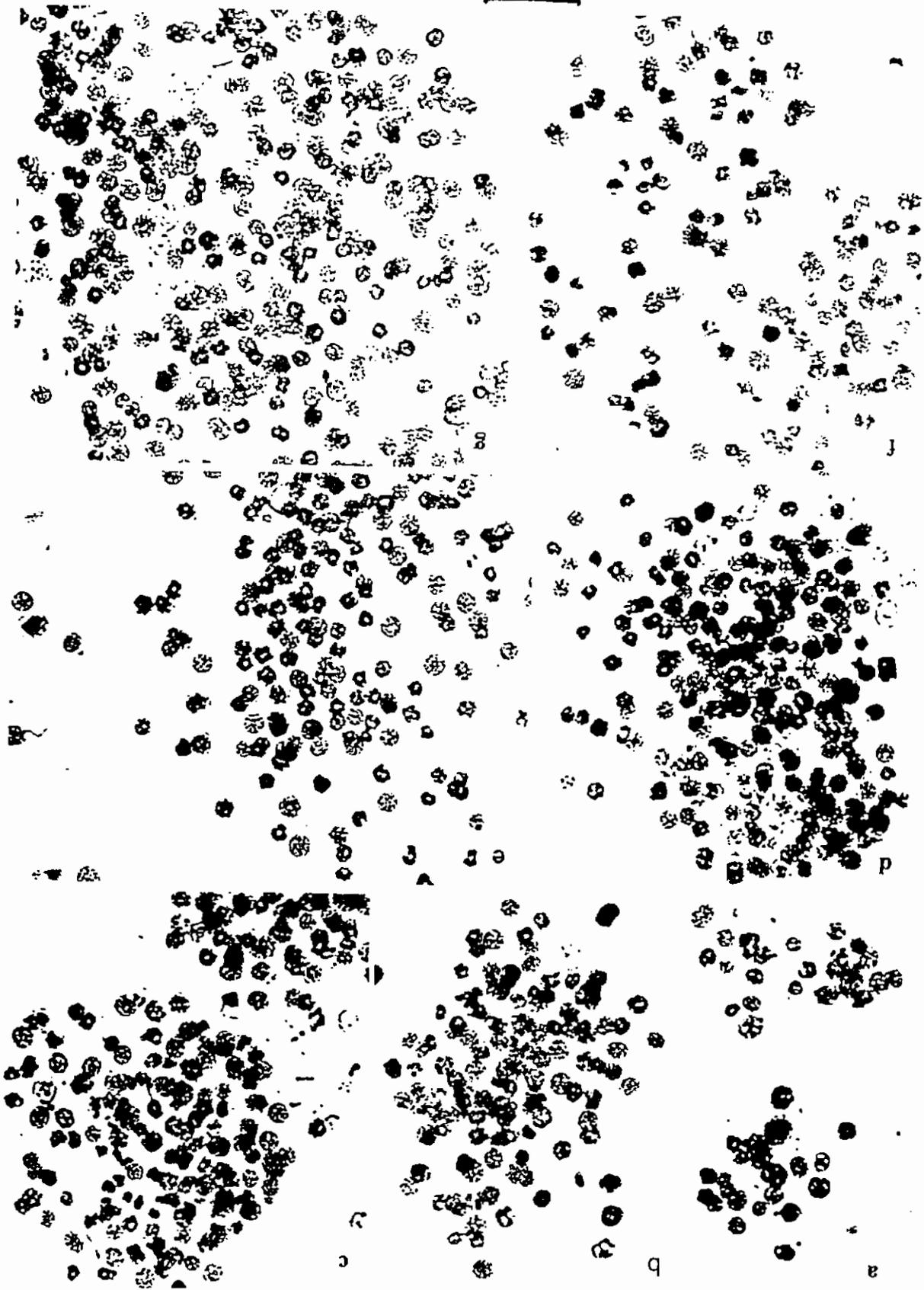






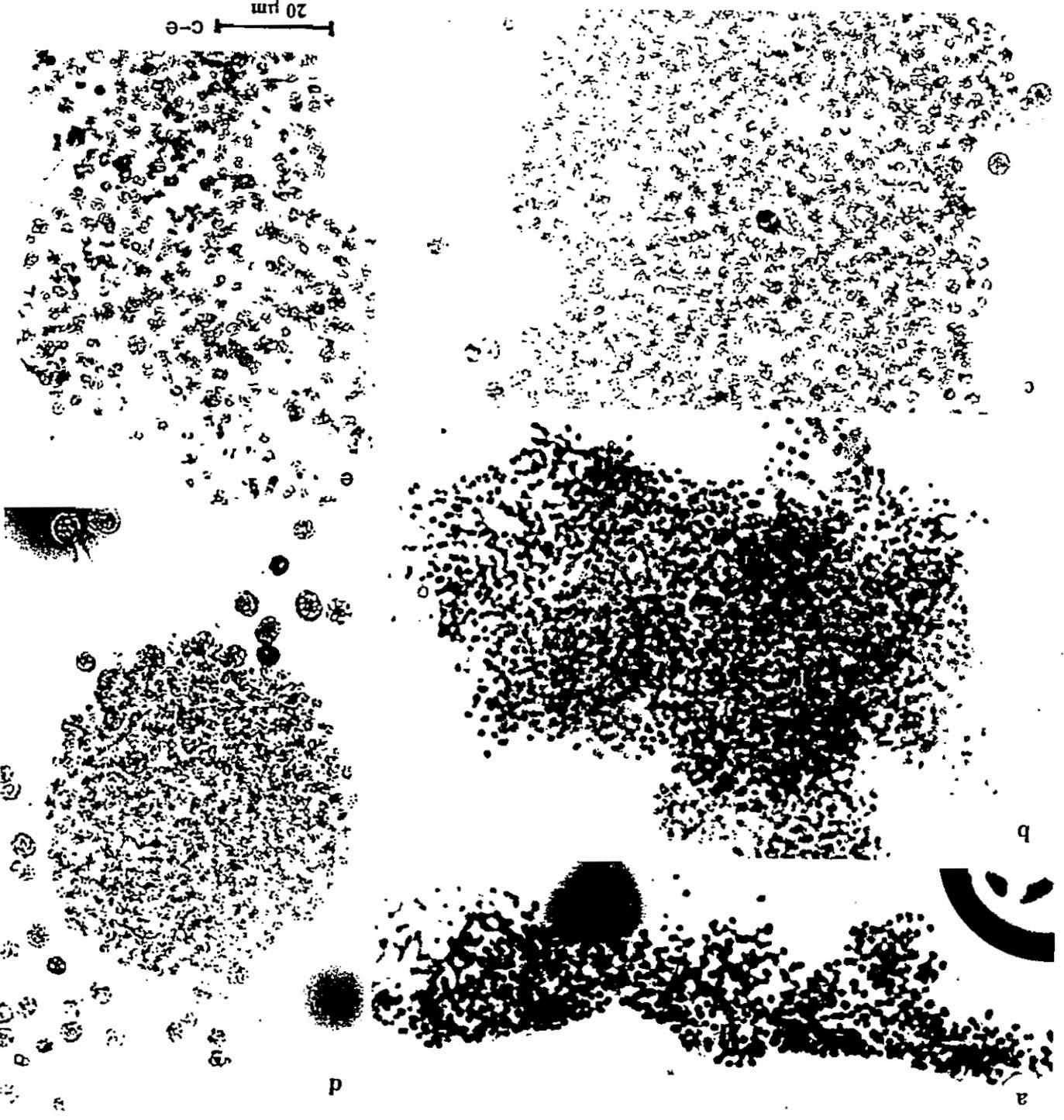


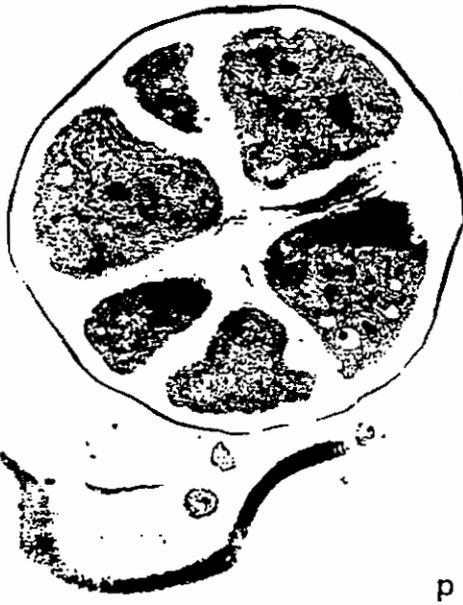
20 μm



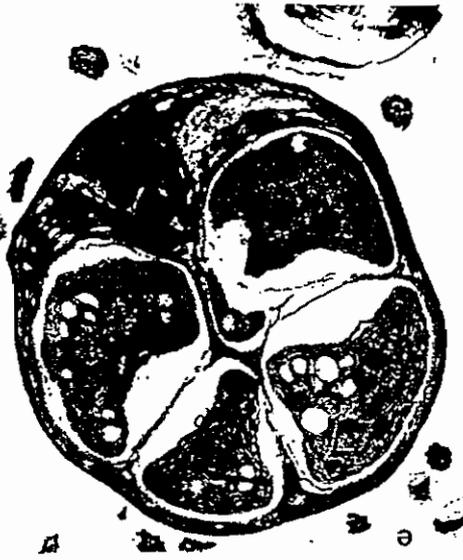
301

20 μm
c-e

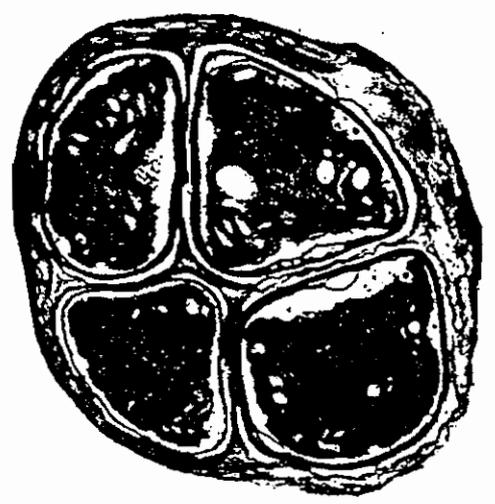




P



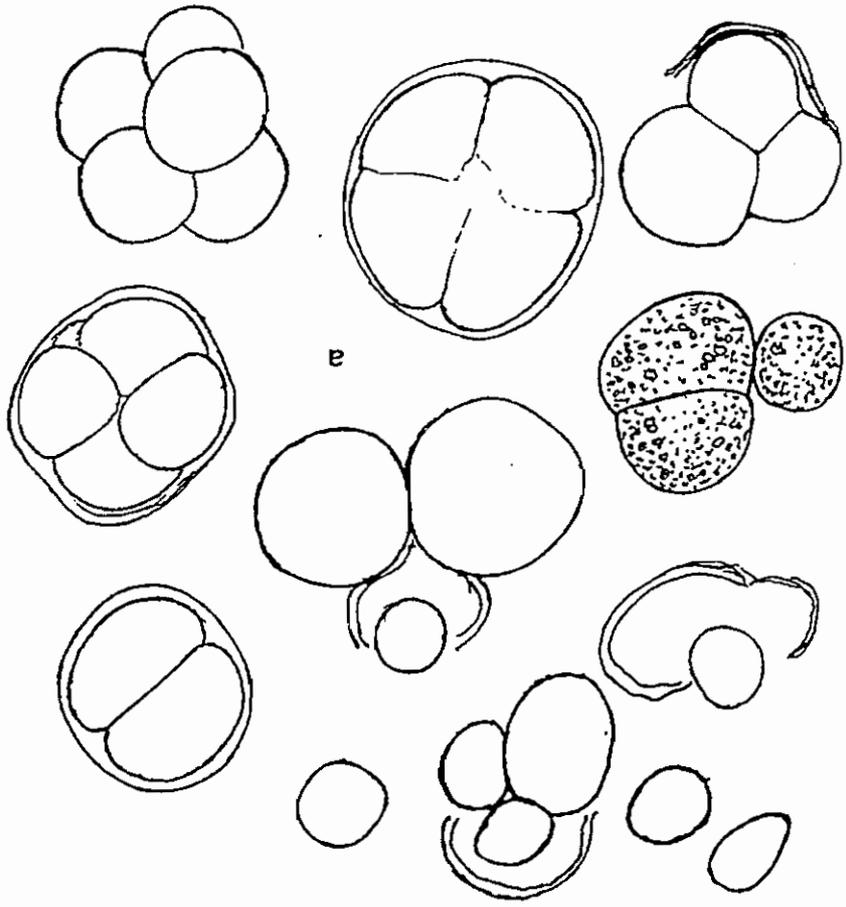
A



J



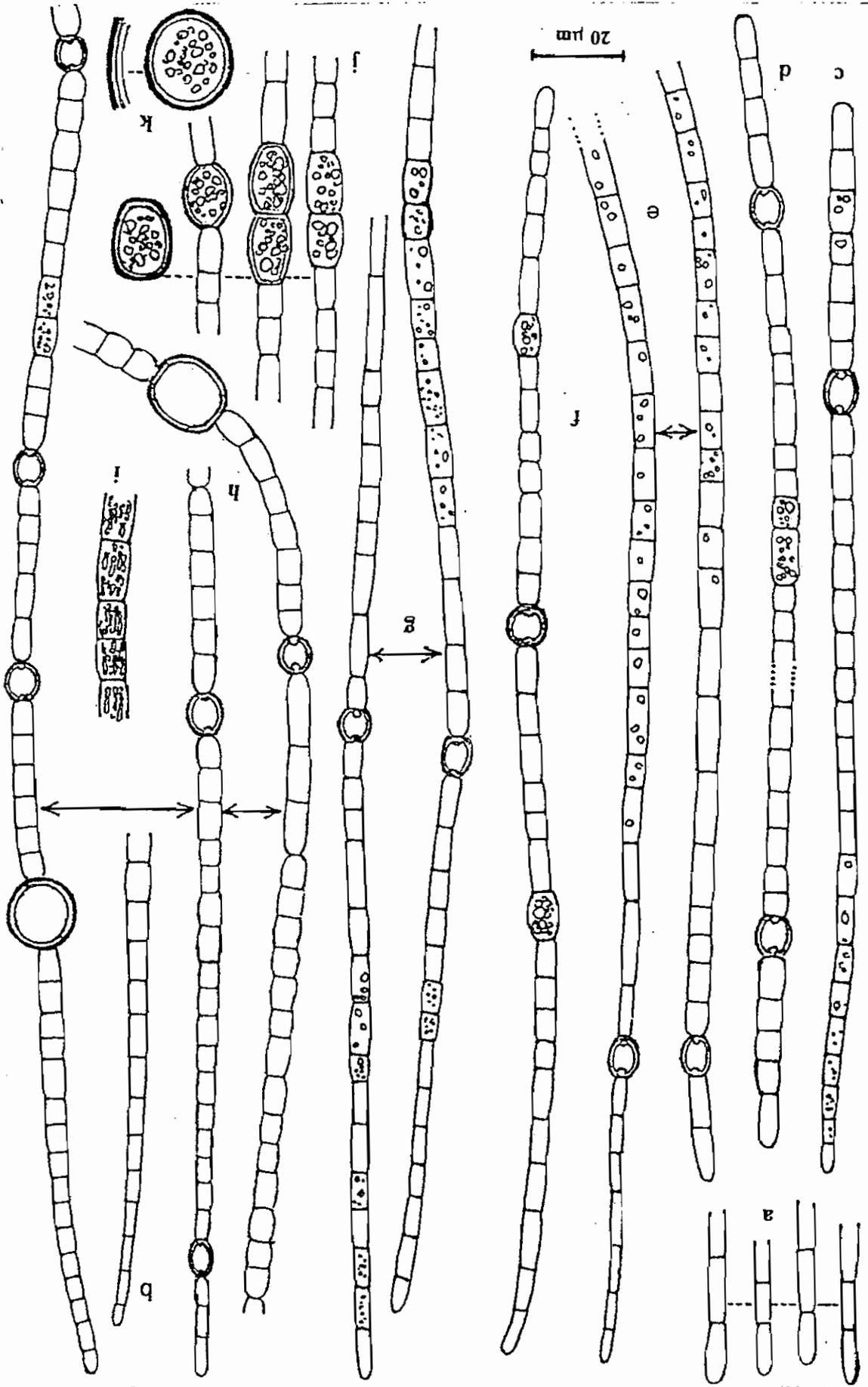
C



a



q



Phytoplankton species composition is more sensitive than OECD criteria to the trophic status of three Brazilian tropical lakes

V. L. M. Huszar, L. H. S. Silva, P. Domingos, M. Marinho & S. Melo

Laboratory of Phycology, Dept. Botany, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, Rio de Janeiro, 20 940-040, Brazil

Key words: trophic gradient, phytoplankton, tropical freshwater environments, species assemblages, shallow lakes

Abstract

We compared the structure and function of the phytoplankton community in three tropical systems in Brazil: an oligo-mesotrophic floodplain lake; an eutrophic reservoir; and a hypereutrophic coastal lagoon. Phytoplankton biomass increased along this trophic gradient averaging 2.6, 6.2 and 31.6 $\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$ in the lake, reservoir and lagoon, respectively. Similarly, production increased from 427 to 918 $\text{gC m}^{-2} \text{y}^{-1}$. Along the trophic gradient, diversity and species richness of phytoplankton decreased. There was, however, no relationship between trophic and rates of change of phytoplankton communities or the ratio of maximum/mean biomass. Phytoplankton size varied between systems with small algae (2–20 μm) dominating in the hypereutrophic lagoon and larger algae (20–200 μm) dominating in the other systems. Many of the trophic indices developed for temperate areas could not be applied to these tropical systems since there was no clear relationship between Secchi depth, chlorophyll, or TP and trophic status. Phytoplankton species may be more useful than these trophic indices to the classification of the condition of tropical lakes.

Introduction

The structure of the phytoplankton associations and the abundance of species vary along trophic and seasonal gradients (Reynolds, 1984). Interactions between these gradients distinguish among the functional characteristics of species to influence the composition of phytoplankton assemblages (Seip & Reynolds, 1995).

Despite the considerable data available about phytoplankton ecology, new considerations have not emerged concerning the trophic gradient since the preliminary revision of Kalff & Knoechel (1978). Phytoplankton responses have been treated primarily in terms of concentrations of chlorophyll *a*. The management of lakes and reservoirs has fostered an increasing interest on the use of assemblages of species that indicate trophic levels, but the attributes of these communities have been rarely used in these evaluations. Other aspects of the structure and function of the phytoplankton community, such as seasonality of biomass, growth rates, cell volume, etc., may also be related to

the trophic gradient (Smith, 1978; Alvarez-Cobelas & Rojo, 1994; Seip & Reynolds, 1995).

The literature about distribution of species among trophic categories is wide, contradictory, and refers mainly to temperate-zone environments. The difficulty of transposing findings from temperate lakes to tropical ones was pointed out long ago by Thienemann (1955). The inadequacy of the criteria applied to lakes in Brazil has recently been given new emphasis by Esteves (1988), who pointed out that the indicators that are most used in typology of temperate lakes do not hold in tropical waters. Determinands such as the concentration of organic matter in the sediment, the concentration of oxygen in the hypolimnion, phytoplankton production (profiles and its magnitude) and diversity of species, often bias towards an inappropriate trophic classification when applied to tropical lakes. Higher temperature and differences in thermal stability and nutrient recycling are among the factors likely to influence the responses of phytoplankton and,

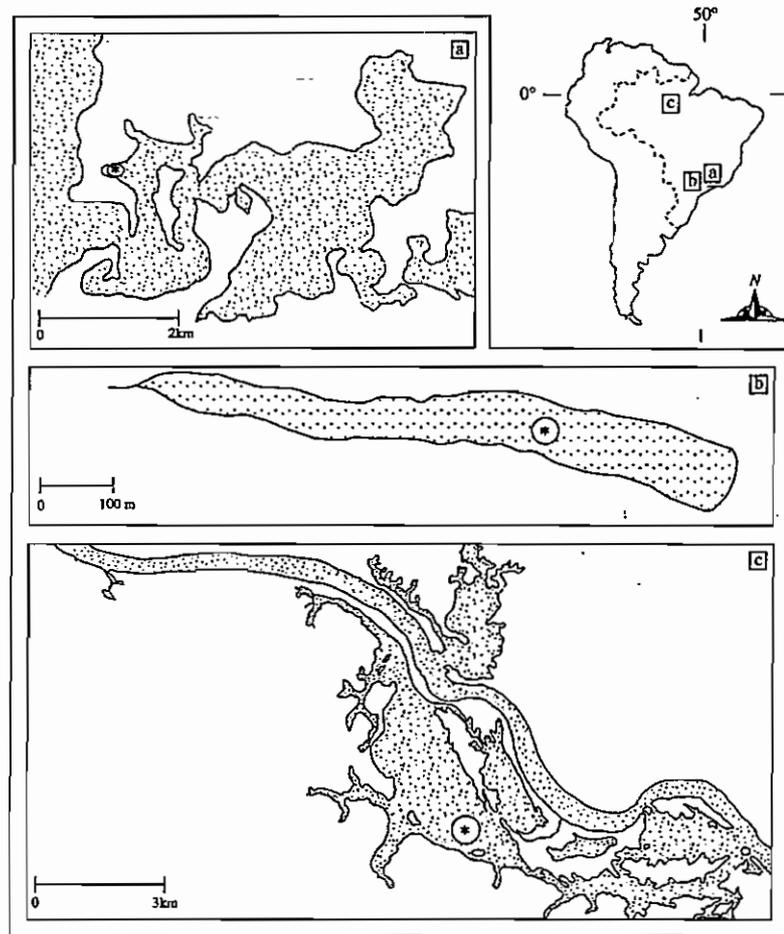


Figure 1. Maps of Barra Lagoon (a), Monte Alegre Reservoir (b) and Batata Lake (c), showing the geographic location and sampling stations.

hence, to distort the interpretation of the relation of the community composition to the trophic status.

The present study discusses some ecological aspects of the phytoplankton composition of three tropical environments, which are taken as representative of the Brazilian aquatic ecosystems, with respect to trophic state and seasonality.

Description of study sites

The main characteristics of the lakes are summarized in Table 1. Batata Lake (Figure 1c) is situated in the Amazon region, of northern Brazil; it is a floodplain lake with clear waters, is moderately acidic and is deficient in most nutrients. It is permanently connected to Trombetas River, a tributary of the Amazon. It is characterized by the distinctive annual fluctuation of

its surface level (Huszar, 1994). There is no input of anthropogenic organic matter to the lake (Esteves et al., 1990). However, the lake received bauxite tailings from ore processing, between 1979 and 1989, which now cover 30% of the total lake area at high water (Roland & Esteves, 1993). The ratio N/P and the low concentrations of soluble reactive phosphorus indicate that capacity limitation by phosphorus is more likely. Mixing of the entire water column varies in frequency from daily to several days, depending on the lake depth (Melo, 1996).

Monte Alegre Reservoir (Figure 1b) is situated in the southeast of Brazil. Its waters drain areas of rich soils. It has a relatively long hydraulic residence time and is not managed for water supply. Its waters are slightly acid and the N/P ratio fluctuates, but neither N nor P was ever found to have fallen to growth-limiting

Table 1. Location, morphometrical data and water variables of the lakes (LW = low water; HW = high water).

	Batata Lake		Monte Alegre Reservoir		Barra Lagoon	
Latitude	56°14'W, 1°28'S		47°43'W, 21°11'S		42°43'W, 22°55'S	
Area (km ²)	LW-18; HW-31		0.07		6.2	
Volume (10 ⁶ m ³)	40		0.2		-	
Mean depth (m)	2.2		2.9		-	
Maximum depth (m)	12		5		1.6	
Residence time (days)	not estimated		45		30	
	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
Secchi depth (m)	0.9-2.1	1.2	0.9-2.1	1.4	0.2-0.6	0.3
pH	5.1-6.4	5.7	5.3-7.2	6.2	8.1-9.4	9.0
Carbon dioxide (mM)	0.06-0.6	0.16	-	-	-	-
Alkalinity (mEq l ⁻¹)	0.006-0.111	0.045	-	-	-	-
Water temperature (°C)	26-33	30	20-28	24	22-30	28
Conductivity (μS cm ⁻¹)	7-16	9.9	66-142	81.2	6905-11392	8956
Soluble reactive phosphorus (μg l ⁻¹)	3.1-7.5	5.0	2.2 - 41.9	15.0	3.1-232.5	65.4
Dissolved inorganic nitrogen (μg l ⁻¹)	40-210	124	91-804	295	0-1235	110
Total phosphorus (μg l ⁻¹)	5-60	20	12-67	33	113-300	190
Total nitrogen (μg l ⁻¹)	380-1000	559	260 - 840	528	1163-288	1796

concentrations. Mixing of the full water column can occur continuously, daily or irregularly (Arcifa et al., 1990; Silva, 1995). Day-time stratification may occur more frequently in the hot-rainy period.

Barra Lagoon (Figure 1a) is an oligohaline, mildly alkaline coastal lagoon, situated in Southeastern Brazil. It is connected to the sea through two other lagoons. It receives a heavy load of untreated domestic sewage. Mass mortalities of fishes have occurred during summer months. It is a system with continuous or daily mixing, without persistent stratification. No tendency to limitation by phosphorus was registered during the seasonal cycle. However, this system was deficient in dissolved inorganic nitrogen concentrations during most of the year, the exception being in the first three weeks after a mass-mortality of fishes (Domingos et al., 1994).

Materials and methods

Phytoplankton samples were collected at weekly, at stations in the main basin of Batata Lake (Figure 1c), from September 1988 to October 1989, and in Lagoa da Barra (Figure 1a), from October 1990 to June 1991. Samples were taken biweekly at Monte Alegre Reservoir (Figure 1b), April 1988-March 1989). Samples were fixed with Lugol's solution and the phytoplankton

were identified and enumerated following the sedimentation and inverted-microscope method of Utermöhl (1958). At least one hundred specimens of the dominant species were enumerated (Lund et al., 1958) in random fields (Uhelinger, 1964). Specific biomass was estimated from the product of the population and the mean unit volume (Edler, 1979). Species diversity (by biomass) was estimated according to the Shannon-Wiener index (Shannon & Weaver, 1963) and the rate of community compositional change (by biomass) was calculated according to Lewis' (1978) summed-difference method. More details about methodology can be found in Huszar (1994), Domingos et al. (1994) and Silva (1995).

Results

Attributes of the phytoplankton communities are presented in Figures 2-7, considering the following phases: Batata Lake-falling (decreasing of water level), low water, rising (increasing of level water), high water; Monte Alegre Reservoir - I and IV hot-rainy, II cold-dry, III hot-dry to hot-rainy (transition); Barra Lagoon - pre-mortality (A and B), mortality (C) and post-mortality (D). Further details are given in Huszar (1994), Domingos et al. (1994) and Silva (1995).

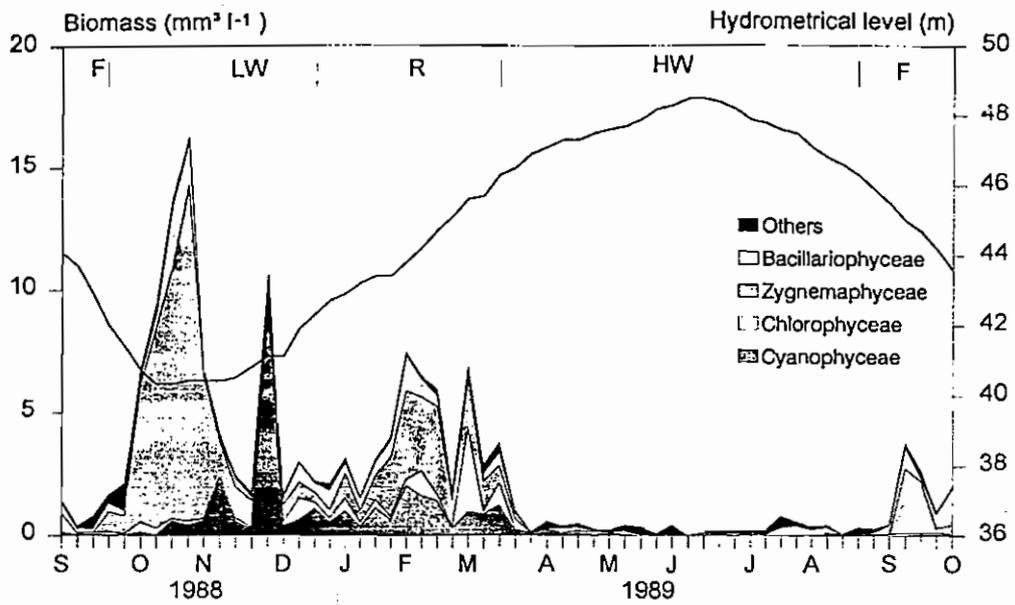


Figure 2. Fluctuations in the phytoplankton biomass (as fresh biovolume) in Batata Lake, subdivided according to phylogenetic affinities, in relation to the level of the Trombetas river and the hydrological phases of the lake. (F= falling; LW= low-water; R= rising; HW= high-water).

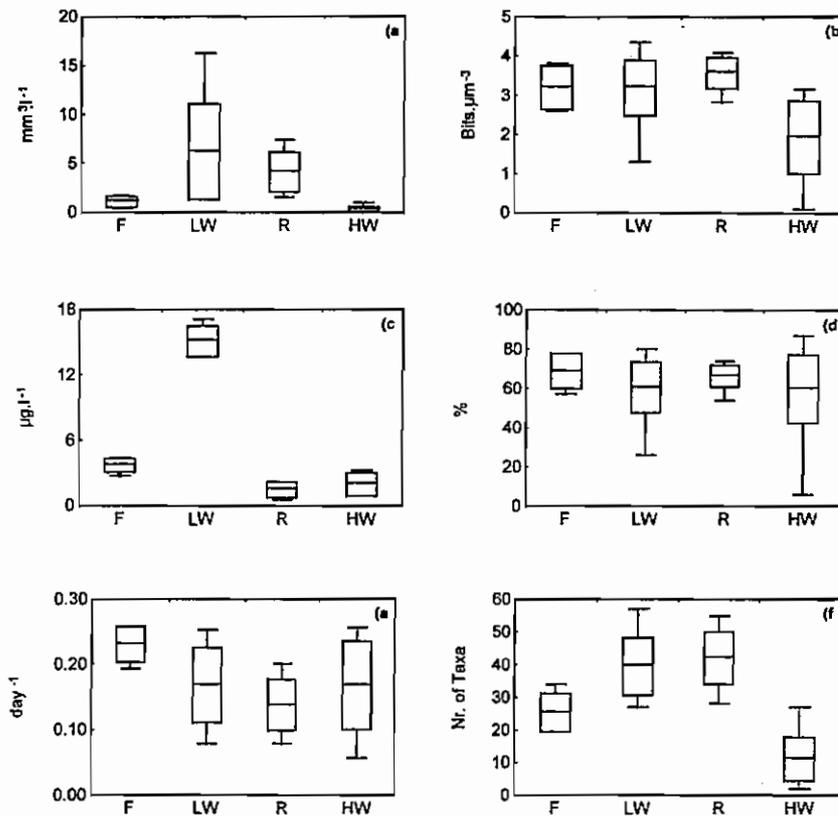


Figure 3. Phytoplankton attributes (a-biomass; b-diversity; c-chlorophyll; d-evenness; e- rate of community change; f-species richness;) of the Batata Lake (range, mean and standard deviation) by phases (F= falling; LW= low water; R= rising; HW= high water).

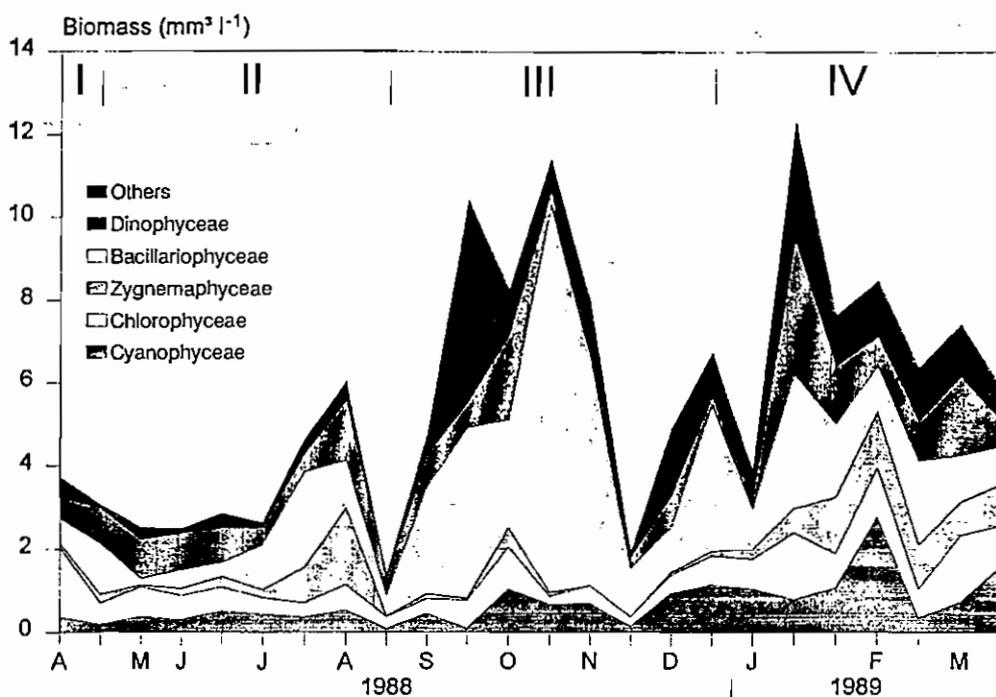


Figure 4. Fluctuations in the phytoplankton biomass (as fresh biovolume) in Monte Alegre Reservoir, subdivided according to phylogenetic affinities, in relation to the phases (I = hot-rainy; II = cold-dry; III = hot-dry to hot-rainy; IV = hot-rainy).

Batata Lake

Under the strong hydrological influence of its flood-plain cycle (Figure 2), Batata Lake was characterised by a season of net growth lasting about seven months (low- and rising- water). In the other months, when the lake was deeper (high- and falling water), biomass was low, mainly as a result of fluvial dilution. Moderate production $427 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ was detected by Roland (1995).

The maximum biomass was around 4.5 times greater than the annual average, and 2.5 times greater than the average for the season of net growth. Three biomass peaks were observed (Figure 2): two in the low water period, one of them with a dominance of desmids – *Staurodesmus triangularis* and *Pleurotaenium tenuissimum* – and the other with a dominance of blue-green algae – *Jaaginema geminatum* and *Oscillatoria cf. transvaalensis*. The third peak, with the same desmids plus *Cosmarium arctoum* and *Jaaginema geminatum*, occurred in the rising period. Only the first period could be considered equilibril, in the sense of Sommer et al. (1993), when two species composed over 80% of the total biomass for about three weeks.

There were 174 species in 58 samples taken over the annual cycle. The phytoplankton assemblages, related to the main dimensions of the trophic spectrum, are expressed in Table 2. Both the species diversity and the species richness were high and these attributes in general fluctuated in a similar manner. Lower values occurred in the high water period. Evenness was almost constant throughout the annual cycle. The rates of community change were high and reached maximal values during the period of falling water (Figure 3).

Organisms $< 20 \mu\text{m}$ dominated the community for about seven months (falling and high water); in the rest of the period (low water and rising) species between 20 and $200 \mu\text{m}$ contributed more than in the other phases. On average, there were about 27 species per sample; 14 contributed over 0.5% to the total biomass, four over 5%, and one over 25%.

The adaptive strategies were separated according to Reynolds (1988). Falling and high water phases are characterized mainly by the dominance of robust and small organisms ($< 20 \mu\text{m}$; C competitor species); at low water, larger organisms with attenuated or elaborated shapes were more important ($20\text{--}200 \mu\text{m}$; R ruderal species), whereas in period of the rising water, both groups occurred together.

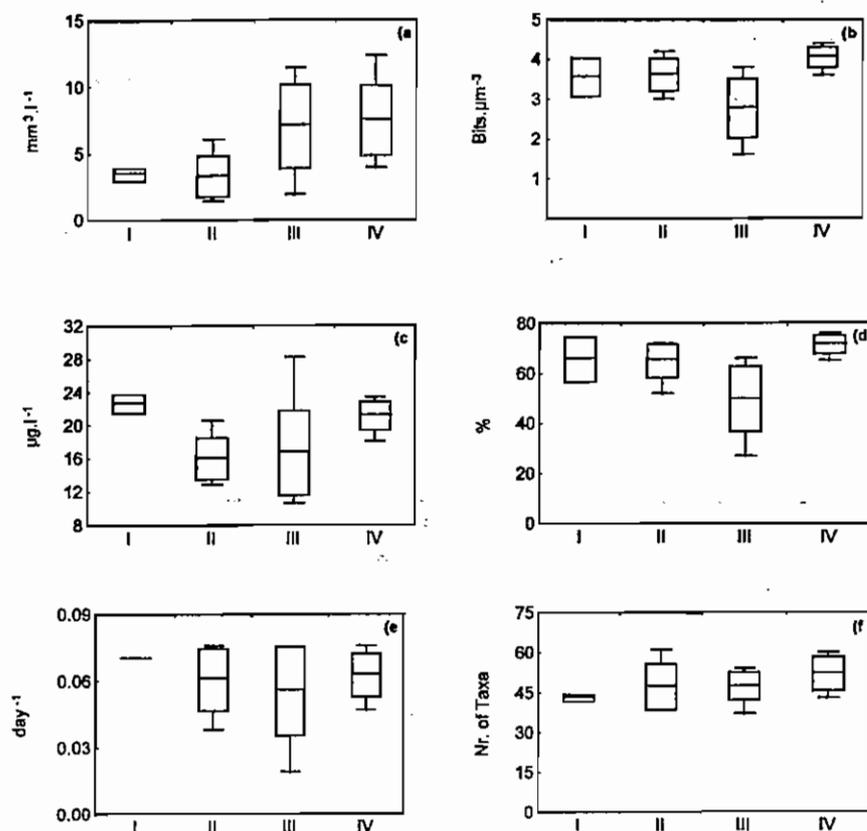


Figure 5. Phytoplankton attributes (a-biomass; b-diversity; c-chlorophyll; d-evenness; e-rate of community change; f-species richness;) of the Monte Alegre Reservoir (range, mean and standard deviation) by phases (I = hot-rainy; II = cool-dry; III = hot-dry to hot-rainy; IV = hot-rainy).

Monte Alegre Reservoir

High phytoplankton biomass (Figure 4) and high primary production ($780 \text{ gC m}^{-2} \text{ y}^{-1}$, Meschiatti et al., 1986) were supported by Monte Alegre Reservoir. The maximum biomass was about 2.2 times higher than the annual mean and there were three seasonal biomass peaks: 1) one in the cold-dry period, when many species contributed similar percentages to the total biomass; 2) one in the hot-dry to hot-rainy transition, composed of diatoms, euglenophyceae and cryptomonads; and 3) in the hot-rainy period, when many species contributed with similar biomass. It was not possible to identify an equilibrium period according to the criteria of Sommer et al. (1993).

A hundred and eighteen species were recorded in Monte Alegre Reservoir. The phytoplankton assemblages and the main dimensions of the trophic spectrum are shown in Table 3. Diversity and species richness were relatively high, in contrast to the rates of community change (Figure 5). The phytoplankton bio-

mass was dominated by species of microplankton (20–200 μm). At an average of about 48 species per sample, 22 contributed more than 0.5% to the total biomass, four with more than 5% and only 1 species with more than 25% (*Aulacoseira granulata*). C and R species dominated, together, most of the year. When stratification was interrupted by mixing periods, the R species, *Aulacoseira granulata*, was dominant.

Barra Lagoon

The Barra Lagoon was found to be a very productive system ($918 \text{ gC m}^{-2} \text{ y}^{-1}$, Carmouze et al., 1994), experiencing a mass fish mortality in the summer, when the phytoplankton biomass reached its maximum (Figure 6). The maximum biomass was about 2.1 times bigger than the average biomass. Its seasonality could be defined on account of this characteristic (Domingos et al., 1994). Four peaks were identified: two in the pre-mortality period, both dominated by small blue-greens (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*

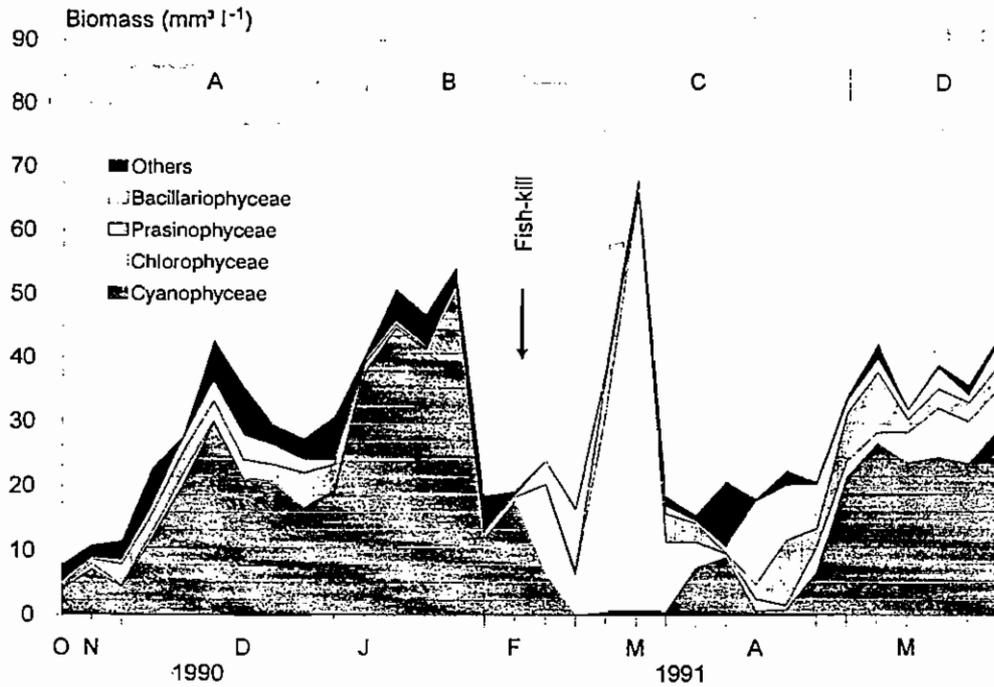


Figure 6. Fluctuations in the phytoplankton biomass (as fresh biovolume) in Barra Lagoon, subdivided according to phylogenetic affinities, in relation to the phases (A and B = pre-mortality; C = fish mortality; D = post-mortality).

Table 2. Biomass averages and phytoplankton assemblages related to the averages of the trophic spectrum in different water phases of Batata Lake.

	Falling	Low-water	Rising	High-water	
Dissolved inorganic nitrogen ($\mu\text{g l}^{-1}$)	243.0	134.0	128.0	94.0	
Soluble reactive phosphorus ($\mu\text{g l}^{-1}$)	3.1	4.4	5.0	7.5	
pH	6.0	5.6	5.9	5.4	
Alkalinity (mEq l^{-1})	0.032	0.016	0.057	0.077	
N/P	60	38	24	60	
Biomass ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0.49	7.63	2.23	0.12	
Assemblages	1. - <i>Cyclotella stelligera</i> - <i>Urosolenia eriensis</i> - <i>Merismopedia tenuissima</i>	2. - <i>Staurodesmus triangularis</i> - <i>Pleurotaenium tenuissimum</i> - <i>Staurastrum pseudotetracerum</i> - <i>Aulacoseira granulata</i>	3. - <i>Jaaginema geminatum</i> - <i>Oscillatoria cf. transvaalensis</i>	4. - <i>S. triangularis</i> - <i>P. tenuissimum</i> - <i>Cosmarium arctoum</i> - <i>J. geminatum</i> - <i>M. tenuissima</i> 5. - <i>Botryococcus fernandoi</i> - <i>C. arctoum</i> - <i>J. geminatum</i> - <i>M. tenuissima</i> - <i>Peridinium umbanatum</i>	6. - <i>Cryptomonas cf. marsonii</i> - <i>C. stelligera</i> - <i>Chromulina gyrans</i> - <i>P. umbanatum</i>

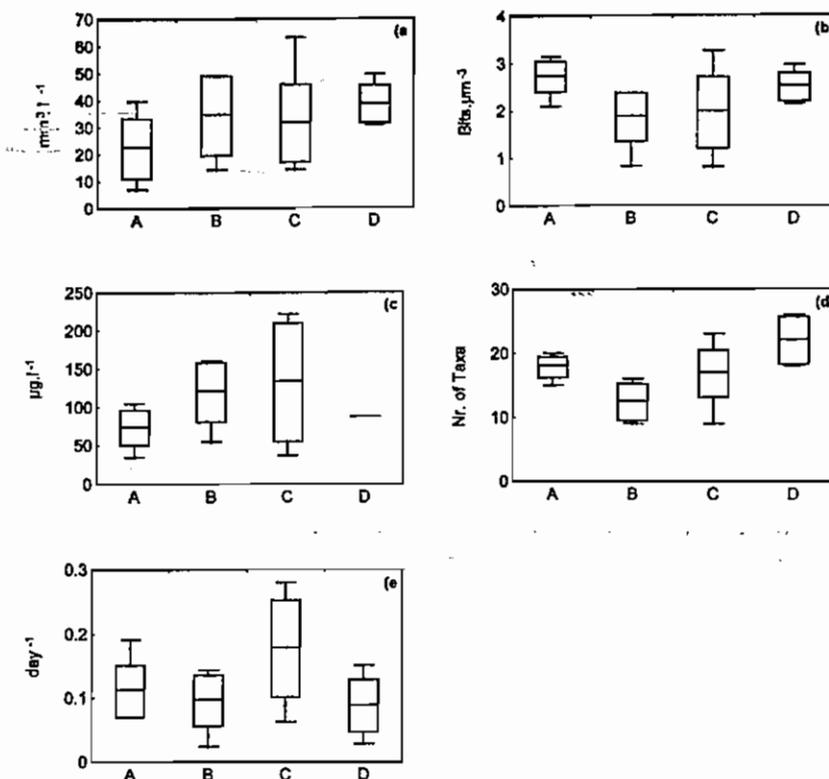


Figure 7. Phytoplankton attributes (a-biomass; b-diversity; c-chlorophyll; d-species richness; e-rate of community change) of the Barra Lagoon (range, mean and standard deviation) by phases (A and B = pre-mortality; C = fish mortality; D = post-mortality).

Table 3. Biomass averages and phytoplankton assemblages related to the averages of the trophic spectrum in different water phases of Monte Alegre reservoir.

	Cold-dry period	Hot-dry to hot-rainy period	Hot-rainy period
Dissolved inorganic nitrogen ($\mu\text{g l}^{-1}$)	445.2	128.0	219.3
Soluble reactive phosphorus ($\mu\text{g l}^{-1}$)	14.5	19.1	18.0
pH	6.1	6.3	6.1
N/P	-	13	10
Biomass ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	4.2	7.0	7.4
Assemblages	1. - <i>Aulacoseira granulata</i> - <i>Peridinium umbonatum</i> - <i>P. volzii</i> - <i>Staurastrum tetracerum</i> - <i>Staurodesmus cuspidatus</i> - <i>Staurodesmus phimus</i>	2. - <i>Lepacinclis ovum</i> - <i>A. granulata</i> - <i>P. volzii</i> 3. - <i>A. granulata</i>	4. - <i>A. granulata</i> - <i>P. umbonatum</i> - <i>Actinotaenium perminutum</i> - <i>Cryptomonas marssonii</i> - <i>Phacus longicauda</i> - <i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>flos aquae</i>

and *Synechococcus elongatus*); only the second peak was considered to be an equilibrium period, according to the criteria of Sommer et al. (1993). One of the other two peaks occurred about one month after

the mortality, when *Chlorella vulgaris* var. *autotrophica*, *C. minutissima* and *Scenedesmus intermedius* were dominant. The final peak was recorded three months after the fish mortality, and lasted until the end of the

Table 4. Biomass averages and phytoplankton assemblages related to the averages of the trophic spectrum in different water phases of Barra Lagoon.

	Pre-mortality		Fish-mortality	Post-mortality
	A	B	C	D
Dissolved inorganic nitrogen ($\mu\text{g l}^{-1}$)	40.9	23.1	247.1	–
Soluble reactive phosphorus ($\mu\text{g l}^{-1}$)	21.7	30.5	159.0	–
N/P	13.2	8.2	8.3	–
pH	9.1	9.2	8.8	–
Biomass ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	22.4	34.3	31.3	38.3
Assemblages	– <i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>salina</i>	– <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i>	– <i>Chlorella minutissima</i> – <i>C. vulgaris</i> var. <i>autotrophica</i>	– <i>S. aquatilis</i> f. <i>salina</i> – <i>C. vulgaris</i> var. <i>autotrophica</i>
	– <i>Synechococcus</i> <i>elongatus</i>	– <i>S. elongatus</i> – <i>P. lutherii</i>	– <i>Scenedesmus</i> <i>intermedius</i>	– <i>Oocystis submarina</i> – <i>P. grossii</i>
	– <i>Pavlova lutherii</i>		– <i>Actinocyclus norweggii</i> var. <i>subsalsa</i>	
	– <i>Pyramimonas</i> <i>grossii</i>			

study, with dominance of *Synechocystis aquatilis* f. *salina*. The toxicity of *S. aquatilis* f. *salina* was tested in mice bioassays by Azevedo & Carmouze (1994). They suggested that this small blue-green, in high biomass during its senescent phase, could have produced haemolytic toxins leading to the mass mortality of the filter-feeding fish (*Brevoortia tyrannus*, Clupeidae).

The planktonic flora of the Barra Lagoon comprised 72 species during the year of study (Menezes & Domingos, 1994). Phytoplankton assemblages and their relevance to the trophic spectrum are set out in Table 4. The diversity, species richness and community change rates were relatively low through the year (Figure 7). The post-mortality change rate, however, was high.

Between 90 and 100% of the phytoplankton biomass comprised small and stout organisms $< 20 \mu\text{m}$, with 70 to 90% being $< 10 \mu\text{m}$. *Synechocystis aquatilis* f. *salina* – a characteristic species throughout the year – can be considered a C species because of its short generation time of (ca. 1.7 days, Nascimento, 1996). The small green-alga recorded after mortality can be also considered a C species. The mean of the net rate of increase, estimated according Sommer (1988) in natural population (29°C , 12 hr d^{-1}) by daily sampling during six days, was 0.8 d^{-1} for *Chlorella minutissima*, and 1.4 d^{-1} , for *C. vulgaris* var. *autotrophica*.

Out of an average of 17 species per sample, 12 contributed more than 0.5% to the total biomass, four more than 5% and only one species more than 25% (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*).

Discussion

The majority of the tropical lakes tends to be included among the eutrophic category because of the lack of obvious light limitation, of the small variations of the photoperiod and temperature through the year, and of the regularity of these factors (Thienemann, 1955; Esteves, 1988). Such characteristics impose metabolic patterns that differentiate systems in tropical and temperate regions. However, the concept of trophic status was evolved for temperate lakes and even this is almost wholly evaluated by phosphorus concentration (Moss, 1973; OECD, 1982). Many attributes of the phytoplankton community, however, can be related to the trophic status. With increasing trophy, phytoplankton biomass usually shows larger seasonal fluctuations (Marshall & Peters, 1989) and the fluctuations themselves may often be related to physical variability (Seip & Reynolds, 1995). In each of the present cases, there were three or four seasonal peaks per calendar year and the observed cyclicity is most clearly correlated to physical variables (Figures 2, 4 and 6).

The ratios of maximum biomass/mean annual biomass were similar in all the three environments. The maximum and mean biomass, and annual production per unit area were higher in the coastal lagoon than in the other systems; however, richness and diversity were smaller. Community change rates were more striking in the floodplain lake than in the other systems, which can be related mainly to the protracted flood pulse to which it is submitted. Relatively low rates occurred in the reservoir and in the coastal lagoon, except imme-

diately after the fish mortality, when they were high (Figure 7).

The morphological/functional strategies of the phytoplankton organisms, established by Margalef (1978) and Reynolds (1988), seem to co-vary loosely with the trophic gradient. The S stress-tolerant species dominate when nutrients become depleted or when they are chronically in low concentrations; C species do the opposite; and R species are tolerant of low light and many live in eutrophic environments (Reynolds, 1988). We observed a dominance of C species throughout the year in the coastal lagoon; coexistence of C and R or dominance of only R species in the reservoir; and alternation of C species, during high water, with C and R species, in the other periods in the floodplain lake, seem to indicate this tendency. Our observations are consistent with the tendencies proposed.

The occurrence of smaller organisms in oligotrophic waters, and progressively larger organisms with increasing nutrient status has been noted by Harris (1994). A trend to dominance by smaller organisms in the oligotrophication process was observed by Willén (1985). No such trend was evident in the lakes. The coastal lagoon, with high levels of nutrients, presented dominance of small algae (pico/nanoplankton). On the other hand, in the reservoir and during the season of net growth in the floodplain lake, both with a moderate concentration of nutrients, microplankton algae contributed a bigger share to the biomass.

The criteria given in literature for the classification of the trophic states of lakes, including OECD (1982), introduce problems of interpretation, when interregional comparisons are made. Taking into account the OECD (1982) criteria regarding the total-P levels, Batata Lake and Monte Alegre Reservoir could be classified as mesotrophic and Barra Lagoon as hyper-eutrophic. Considering the concentration of chlorophyll *a*, the first two systems could be included in the eutrophic category and the coastal lagoon in the hypertrophic category. Considering the mean and minimum transparency of the water, all environments would be hypertrophic. The existence of a trophic gradient is a fact, but the delimitation of each level is not always clear. Furthermore, extreme situations are more easily defined than intermediate levels, because the latter are found sometimes in one category, sometimes in another, depending on the criteria.

The assemblages of species can be important to the resolution of the trophic status, since the species indicate the complexity of the processes in the system. In general, assemblages with oligo-mesotrophic

tendencies were registered in Batata Lake (Huszar & Reynolds, 1997); for example, *Cyclotella/Urosolenia/Merismopedia*, are more frequently associated with oligotrophic and moderately eutrophic systems (Reynolds, 1984; Reynolds, 1998). The *Staurodesmus/Pleurotaenium/Staurastrum/Cosmarium* grouping, largely known as dominants in phosphorus-poor environments. Eutrophic species however, were also represented as *Aulacoseira granulata*, which is typical of eutrophic environments of low latitudes (Kilham & Kilham, 1975). Despite its relatively broad distribution in the growth period, this species has always occurred in relatively low biomass. *Jaaginema* and *Oscillatoria*, recorded in the lake at the low water phase, belong to an assemblage considered to be eutrophic and characteristic of shallow, turbid and well-mixed environments (Alvarez-Cobelas & Jacobsen, 1992; Reynolds, 1994). The dominance of oligotrophic desmids was a clear feature of the growth period in the floodplain lake, coinciding with the high availability of free CO₂ (0.16 mM). These assemblages correspond to the drainage characteristics of Batata Lake and the nutrient-poor low alkalinity waters of the Trombetas river (Roland, 1995).

The species that contributed most to the phytoplankton biomass of Monte Alegre Reservoir featured assemblages of the type *Aulacoseira/Staurastrum/Staurodesmus/Peridinium* in cold-dry period; *Lepocinclis/Aulacoseira* in the transition period, or almost exclusive dominance of the latter, after mixings of water column. *Aulacoseira/Cryptomonas/Phacus/Actinotaenium/Peridinium/Microcystis* characterized the hot-rainy period with more prolonged stratification. Except for some desmids species, the other taxa registered in these assemblages are said to be characteristic of mesotrophic and eutrophic environments (Reynolds, 1997). In fact, the watershed of Monte Alegre Reservoir is located in naturally-rich agricultural soils. Periodical and irregular mixing happened throughout the annual cycle, which may explain the absence of dominance by species such as *Microcystis aeruginosa*, characteristic of the late summer in eutrophic environments of temperate areas (Reynolds, 1980), and in stable phases of hot-rainy periods in Brazilian tropical reservoirs (Tundisi, 1990). The mixing contributed to the dominance of *A. granulata*, typical species of well-mixed eutrophic environments (Lima et al., 1979).

In Barra Lagoon, non nitrogen-fixing Chroococcales (*Synechocystis/Synechococcus*) extensively dominated the phytoplankton. High pH values and low free CO₂ may account for dominance by such species

(Shapiro, 1990). Phytoplankton assemblages reflected the richness of the drainage basin (high availability of nutrients). In addition, the acknowledged euryhalinity of *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, *Synechococcus elongatus*, *Pyramimonas grossii* and *Pavlova lutherii* (Menezes & Domingos, 1994) suggest the selectivity of a marine influence. Assemblages found in the Barra Lagoon were formed by species of blue-green algae, flagellates and Chroococcales, dominant groups in hypertrophic environments (Alvarez-Cobelas & Jacobsen, 1992). The pre-mortality was characterized by the *Synechocystis/Synechococcus/Pavlova/Pyramimonas* assemblage and the mortality, by *Chlorella/Scenedesmus/Actinocyclus* or *Chaetoceros/Pyramimonas*. After the return of the similar initial conditions, the assemblages become similar too, with high biomass of *Synechocystis/Synechococcus* supported by some *Oocystis/Actinocyclus*. The exceptional fish mortality resulted in an important elevation in the concentration of NH_4^+ ions, from the decomposition of fish mass, and a fall in pH (Carmouze et al., 1994), promoting the immediate substitution of the blue-green dominance by *Chlorella/Scenedesmus/Actinocyclus* assemblage.

Blue-green algae at high biomass have often been considered characteristic of eutrophic environments. These algae, however, are not exclusive to productive environments. They can be an important part of the plankton of non-eutrophic environments as, for example, some large African lakes that are not very productive (Hecky & Kling, 1987). This is also shown in the trophic spectrum synthesized by Reynolds (1997). In the floodplain lake, blue-greens contributed with about 5 to 30% of the biomass in the season of net growth, dominating for a week.

In shallow tropical environments, nutrient availability does not provide a good indicator of the trophic level. The concentrations of dissolved inorganic nutrients fractions do not represent the true availability of resources to the organism metabolism, owing to high cycling and uptake rates (Esteves, 1988). In Brazilian coastal lagoons, for example, around 70% of the organic matter is recycled in the water column (Machado, 1989; Carmouze et al., 1994). Inadequacy of the transparency as an indicator of the trophic nature of these systems is directly influenced by resuspension of fine material from shallow sediments. Thus, the effect of the nutrient availability on the phytoplankton, usually defining the trophic nature of these systems, is greatly modified by extensive shallows. Besides, the effect of the nutrient availability over the phytoplankton is usually difficult to evaluate owing to the difficulty of its

detection, especially of SRP, and to the low levels actually required to saturate the growth of algae (Reynolds, 1992).

It is important to point out that biomass, productivity, and chlorophyll *a*, all attributes which are also used to evaluate the trophic states of environments, are usually inadequate to characterise shallow tropical lakes. According to current terminology, based substantially on the system evolved for deep, temperate lakes, many shallow tropical lakes would be determined to be eutrophic.

Moss's (1973) diagram, which is based on the distribution of phytoplankton species and on environmental factors (especially the chemical composition of water), permits systems which are not easily classified by their nutrient concentration to be assimilated more satisfactorily. From his diagram, it is possible to include lakes with high productivity and high biomass made up of assemblages usually considered to be oligotrophic. The floodplain lake studied, considered by the OECD (1982) system as mesotrophic (by total-P) or eutrophic (by chlorophyll *a*), supports dominant assemblages of oligo-mesotrophic species. A similar situation occurred in the reservoir, whose classification by the OECD criteria, permits its inclusion it as mesotrophic (total-P) or eutrophic (chlorophyll *a*), but considering Moss's diagram, the reservoir classification was better defined as eutrophic, due to the larger contribution of species mentioned as typical of these environments (Reynolds, 1998).

The pH/CO₂ system contributes to the definition of the assemblages, clearing situations that were, at first sight, those other trophic states. The CO₂ system (Talling, 1976) and the competition for dissolved inorganic carbon (Williams & Turpin, 1987) play an important role determining the qualitative composition of phytoplankton and the capacity to use bicarbonate as a carbon source is a fundamental ability of eutrophic species (Moss, 1973). It is important to point out, however, the need for a clear definition of the concept of oligotrophic and eutrophic species. The approach of active inorganic carbon transport and its concentrating mechanisms (Williams & Turpin, 1987; Raven, 1991) perhaps can be invoked.

In this way, Moss's diagram seems to be the conceptual model that included more adequate attributes to the trophic classification of the Brazilian tropical lakes analyzed, since it takes into account both strategies of phytoplankton species, from the availability of free CO₂ and bicarbonates (Thienemann-Naumann's original sense), and the nutrient availability and the

productivity of these systems (recent usage). For the shallow tropical environments, it is also important to consider the physical factors, such as the river influence and periodical mixing of the water column, that affect the variables used in the trophic determination.

Acknowledgements

To Dr. Francisco Esteves, Dr. Marlene Arcifa and Dr. Jean-Pierre Carmouze for the opportunity to study these interesting environments. To Dr. C.S. Reynolds for his comments on the manuscript. To CNPq, Brasília, Brasil; CAPES, Brasília, Brasil; FUJB-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil; MRN, Rio de Janeiro, Brasil; FAPESP, São Paulo, Brasil; UNESCO, Uruguay; and ORSTOM, France for financial support.

References

- Alvarez-Cobelas, M. & B. A. Jacobsen. 1992. Hypertrophic phytoplankton: an overview. *Freshwat. Forum* 2: 184-199.
- Alvarez-Cobelas, M. & C. Rojo. 1994. Spatial, seasonal and long term variability of phytoplankton photosynthesis in lakes. *J. Plankton Res.* 16: 1691-1716.
- Arcifa, M. S., A. J. Meschiatti & E. A. T. Gomes. 1990. Thermal regime and stability of a shallow tropical reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Rev. Hydrobiol. trop.* 23: 271-281.
- Azevedo, S. M. F. O. & J. P. Carmouze. 1994. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophycées. Coïncidence ou conséquence? *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 265-272.
- Carmouze, J. P., B. Farias & P. Domingos. 1994. Evolution du métabolisme d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 199-215.
- Domingos, P., V. L. M. Huszar & J. P. Carmouze. 1994. Composition et biomasse du phytoplancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 235-250.
- Edler, L. (ed.). 1979. Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. (Unesco, Working Group 11. Baltic Marine Biologists). 38 pp.
- Esteves, F. A., 1988. Considerações sobre a aplicação da tipologia de lagos temperados a lagos tropicais. *Acta Limnol. bras.* 2: 3-28.
- Esteves, F. A., R. Bozelli & F. Roland, 1990. Lago Batata: um laboratório de limnologia tropical. *Ciência Hoje* 64: 26-31.
- Harris, G. P., 1994. Pattern, process and prediction in aquatic ecology: a limnological view of some general ecological problems. *Freshwat. Biol.* 32: 143-160.
- Hecky, R. & H. J. Kling. 1987. Phytoplankton ecology of the great lakes in the rift valleys of central Africa. *Arch. Hydrobiol.* 25: 197-228.
- Huszar, V. L. M., 1994. Fitoplâncton de um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita: estrutura da comunidade, flutuações espaciais e temporais. Doctoral thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 219 pp.
- Huszar, V. L. M. & C. S. Reynolds, 1997. Phytoplankton periodicity and sequences of dominance in an Amazonian flood-plain lake (Lago Batata, Pará, Brazil): responses to gradual environmental change. *Hydrobiologia* 346: 169-181.
- Kalfi, J. & R. Knoechel. 1978. Phytoplankton and their dynamics in oligotrophic and eutrophic lakes. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 9: 475-495.
- Kilham, S. S. & P. Kilham, 1975. *Melosira granulata* (Ehr.) Ralfs: morphology and ecology of a cosmopolitan freshwater diatom. *Verh. int. Ver. Limnol.* 19: 2716-2721.
- Lewis, W.M. Jr., 1978. Analysis of succession in a tropical phytoplankton community and a new measure of succession rate. *Am. Nat.* 112: 401-414.
- Lima, W. C., J. G. Tundisi & M. Marins, 1979. A systemic approach to the sensitivity of *Melosira italica* (Ehr.) Kutz. *Revta. bras. Biol.* 39: 559-563.
- Lund, J. W. G., C. Kipling & E. D. LeCren. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.
- Machado, E. C., 1989. Desoxigenação e regeneração de nutrientes na lagoa de Guarapina, Rio de Janeiro. Dissertation. Universidade Federal Fluminense, Niterói. 130 pp.
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta.* 1: 493-509.
- Marshall, C. T. & R. H. Peters. 1989. General patterns in the seasonal development of chlorophyll *a* for temperate lakes. *Limnol. Oceanogr.* 34: 856-867.
- Melo, S., 1996. Influência do ciclo hidrológico sobre as variações nictemerais do fitoplâncton de um lago amazônico (Lago Batata, Pará, Brasil). Dissertation. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 61 pp.
- Menezes, M. & P. Domingos, 1994. Flore planctonique d'une lagune tropicale (Brésil). *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 273-297.
- Meschiatti, A. J., E. A. T. Gomes, L. V. Lang, R. A. Rodrigues & R. M. Hamasaki, 1986. Estudos limnológicos no lago da fazenda Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP. Dissertation. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 133 pp.
- Moss, B., 1973. The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study. IV. Growth of test species in natural lake waters and conclusion. *J. Ecol.* 61: 193-211.
- Nascimento, S. M., 1996. Um estudo ecofisiológico de *Synechocystis aquatilis* f. *salina*: a razão N/P e sua relação com o crescimento e a atividade fotossintética. Dissertation. Universidade Federal Fluminense, Niterói. 74 pp.
- OECD, 1982. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD, Paris, 154 pp.
- Raven, J. A., 1991. Implications of inorganic carbon utilization: ecology, evolution and geochemistry. *Can. J. Bot.* 69: 908-924.
- Reynolds, C. S., 1980. Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying systems. *Holarct. Ecol.* 3: 141-159.
- Reynolds, C. S., 1984. Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwat. Biol.* 14: 111-142.
- Reynolds, C. S., 1988. Functional morphology and adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In Sandgren C. D. (ed), Growth and survival strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 388-433.
- Reynolds, C. S., 1992. Eutrophication and the management of planktonic algae: What Vollenweider couldn't tell us. In Sutcliffe, D. W. & J. G. Jones (eds), Eutrophication: research and application to water supply. Freshwater Biological Association, Ambleside: 4-29.

- Reynolds, C. S., 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 289: 9-21.
- Reynolds, C. S., 1998. What factors influence the composition of phytoplankton in lakes of different trophic status. *Hydrobiologia* 369/370: 11-26.
- Roland, F., 1995. Produção primária fitoplanctônica em um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita, Lago Batata, Pará, Brasil. Doctoral thesis. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 118 pp.
- Roland, F. & F. A. Esteves, 1993. Dynamics of phosphorus, carbon and nitrogen in Amazonian lake impacted by bauxite tailing (Batata Lake, Pará, Brasil). *Verh. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 25: 925-930.
- Seip, K. L. & C. S. Reynolds, 1995. Phytoplankton functional attributes along trophic gradients and season. *Limnol. Oceanogr.* 40: 589-597.
- Shannon, C. E. & W. Weaver, 1963. The mathematical theory of communication. Univ. Illinois Press, Urbana, 173 pp.
- Shapiro, J., 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. int. Ver. Limnol.* 24: 38-54.
- Silva, L. H. S., 1995. Variabilidade temporal na estrutura da comunidade fitoplanctônica de um reservatório eutrófico (Lago Monte Alegre) Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 141 pp.
- Smith, V. H., 1978. Nutrient dependence of primary production in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 4: 1051-1064.
- Sommer, U., 1988. Growth and survival strategies of planktonic diatoms. In Sandgren C. D. (ed). *Growth and survival strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 227-260.
- Sommer, U., J. Padisák, C. S. Reynolds & P. Juhász-Nagy, 1993. Hutchinson's heritage: the diversity-disturbance relationship in phytoplankton. *Hydrobiologia* 249: 1-7.
- Talling, J. F., 1976. The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.* 64: 79-121.
- Thienemann, A., 1955. *Die Binnengewässer in Natur und Kultur*. Springer-Verlag, Berlin, 155 pp.
- Tundisi, J. G., 1990. Distribuição espacial, seqüência temporal e ciclo sazonal do fitoplâncton em represas: fatores limitantes e controladores. *Revta bras. Biol.* 50: 937-955.
- Uhelinger, V., 1964. Étude statistique des méthodes de dénobrement planctonique. *Arch. Sci.* 17: 121-123.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Ver. Limnol.* 9: 1-38.
- Willén, E., 1985. Phytoplankton and reversed eutrophication in lake Mälaren, central Sweden, 1965-1983. *Br. Phycol. J.* 22: 193-208.
- Williams, T. G. & D. H. Turpin, 1987. Photosynthetic kinetics determine the outcome of competition for dissolved inorganic carbon by freshwater microalgae: implications for acidified lakes. *Oecologia* 73: 307-311.

2

2

2

Taxonomic remarks on planktonic phytoflagellates in a hypertrophic tropical lagoon (Brazil)

Patrícia Domingos¹ & Mariângela Menezes²

¹ Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas, NPPN, CCS, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, Brazil

Key words: planktonic phytoflagellates, taxonomy, seasonality, hypertrophic brackish water, tropical coastal lagoon, Brazil

Abstract

The phototrophic flagellate flora of the Barra Lagoon (22°57' S and 42°47' W), Rio de Janeiro State, southeastern Brazil, is described. The lagoon is a shallow, oligohaline, hypertrophic ecosystem in which Cyanophyceae, Chlorophyceae and phytoflagellates are dominant. Between October 1990 and August 1993, weekly integrated samples were collected from a bay, using a plexiglass tube, 8 cm diameter and 1 m length. All identifications, descriptions and measurements were carried out on live or in Lugol-fixed material. A total of 30 taxa, belonging to Euglenophyceae (5), Cryptophyceae (7), Raphidophyceae (1), Dinophyceae (4), Chrysophyceae (3), Prymnesiophyceae (2), Prasinophyceae (7) and Chlorophyceae (1) were identified. All the phytoflagellate species identified have been recorded previously from temperate sites. Nine of them were registered in a tropical water for the first time, suggesting that they have much broader distributions. *Gymnodinium sanguineum*, *Pavlova lutheri* and *Pyramimonas grossii* were the most frequently observed phytoflagellates in this study. The seasonal occurrence and some environmental requirements of selected phytoflagellates species are discussed.

Introduction

In brackish waters, phytoflagellates are of great interest since their presence is characteristic. However, the complexity and the restricted representation in the algal communities of brackish environments, relative to those of other ecosystems, increase the difficulties of defining the biological group (Caljon, 1983). Although there are few descriptive accounts on phytoplankton in Brazilian coastal lagoon systems, a significant diversity and biomass of phytoflagellates has been documented from brackish waters in the coastal region of Rio de Janeiro State (Huszar & Silva, 1992; Menezes & Domingos, 1994). These ecosystems show symptoms of accelerated eutrophication, mainly anthropogenic in origin (Carmouze et al., 1995).

In the course of an ecological investigation of Barra Lagoon, a tropical coastal system in the southeastern

Brazil, we carried out a taxonomic survey of the planktonic algal flora. So far, only those species recorded for the first time in Brazil have been described (Menezes & Domingos, 1994).

This paper offers a more comprehensive account of the phototrophic flagellates of the Barra Lagoon. Moreover we discuss the abundance of the more common phytoflagellate species in relation to some of the environmental variables.

Study site

The Barra Lagoon is a coastal system situated in the northern part of Rio de Janeiro State, southeastern Brazil (22°57' S, 42°47' W). It is a shallow, oligohaline lagoon, strongly impacted by the discharge of domestic sewage, with nitrogen and phosphorous concentrations

Table 1. Some limnological data of Barra Lagoon. * Average values for 1990–1993

Surface area	6.2 km ²
Mean depth	1 m
Retention time	45 m
Mixing frequency	Continuous to daily
TN	1527 µg l ⁻¹ *
pH	8.2*
Salinity	5.4‰ *
DIN	101.5 µg l ⁻¹ *
TP	136.5 µg l ⁻¹ *
DOM	11.5 µg l ⁻¹ *

increasing in consequence. According to the OECD classification (1982), it is a hypertrophic system; like many others, it experiences high pH values associated with episodes of high primary production (Domingos, unpublished data). The Barra Lagoon is indirectly connected with the sea. A small salinity fluctuation was detected during the period of study is indicative of a weak tidal influence. The phytoplankton is dominated by the Cyanophyceae, *Synechocystis aquatilis* Sauvageau f. *salina* (Wisłouch) Komárek and *Synechococcus elongatus* Nägeli, which may produce toxins resulting in summer fish kills, as observed in 1991 (Azevedo et al., 1994). From September to December 1992, the lagoon was subject to a large development of macroalgae, mainly of *Cladophora vagabunda* (Linnaeus) Hoek and *Enteromorpha* sp.

The limnological characters of Barra Lagoon are summarised in Table 1.

Materials and methods

Integrated water samples were collected weekly for three years, from October 1990 to August 1993 at one bay of lagoon, using a plexiglass tube, 8 cm in diameter and 1 m in length. For the qualitative analysis, the samples were carried to the laboratory and kept unpreserved under refrigeration (± 4 °C). For the quantitative analyses, subsamples were fixed immediately with Lugol's solution. All identifications, descriptions, measurements and drawings were made on live and fixed material under light microscope with phase-contrast equipment. The techniques for phytoflagellate identification followed those described in Menezes (1994).

Phytoplankton samples were counted according to Utermöhl (1958), and the biovolumes were calculated

according to Edler (1979). Correlation analysis between fourteen selected species and some environmental variables (nitrate, DOC, DON, DOP, TN:TP ratio, SRP, TP, TN, and Secchi depth) used Pearson's statistic (Sokal & Rolf, 1981) with $N=115$ and $p < 0.05$.

The classification system used was taken essentially from Thronsen (1993). In the classification of Dinophyceae we adopted the criteria of Steidinger & Tangen (1996). The salinity tolerances follow the criteria of Caljon (1983).

The identification and geographical distribution of taxa have been based on the general and regional works for freshwater, brackish and marine waters and on morphological characters observed under light microscopy.

Results

Floristic composition

In the plankton of Barra Lagoon, phototrophic flagellates were represented by 30 taxa accounting 37% of total phytoplankton (Figure 1). When considering the main taxonomic phytoflagellates classes, Prasinophyceae, Cryptophyceae and Euglenophyceae were the most species-rich, followed by Dinophyceae. Chryso-phyceae and Prymnesiophyceae; Raphidophyceae and Chlorophyceae were the least represented (Figure 2).

With regard to the salinity tolerance of the phytoflagellates, limnobiont species dominated in number, followed by brackish and marine species; only one taxon (*Durinskia baltica* (Levander) Carty & Cox) was classified as holoeurihaline (Figure 3). Most freshwater taxa recorded occurred sporadically or rarely in the lagoon, especially species of Chryso-phyceae, Euglenophyceae and the single Chlorophyte, *Selenochloris stigmatophora* (Korsikov) Ettl, with two individuals found in one sample in September, 1992. However, some taxa which usually live in freshwater were common throughout the period investigated, such as *Euglena proxima* Dangeard, *Cryptomonas erosa* Ehrenberg, *Ochromonas mutabilis* Klebs, *Kephyri- on ovale* (Lackey) Huber-Pestalozzi and *Pedinomonas minutissima* Skuja. Prasinophyceae, Cryptophyceae, Dinophyceae and Prymnesiophyceae were the most common groups represented; most species were typical from brackish (*Pyramimonas orientalis* Butcher, *Hemiselmis simplex* Butcher, *Gymnodinium sanguineum* Hirasaka, *Pavlova lutheri* (Droop) Green) or marine environments (*Resultor mikron* Thronsen,

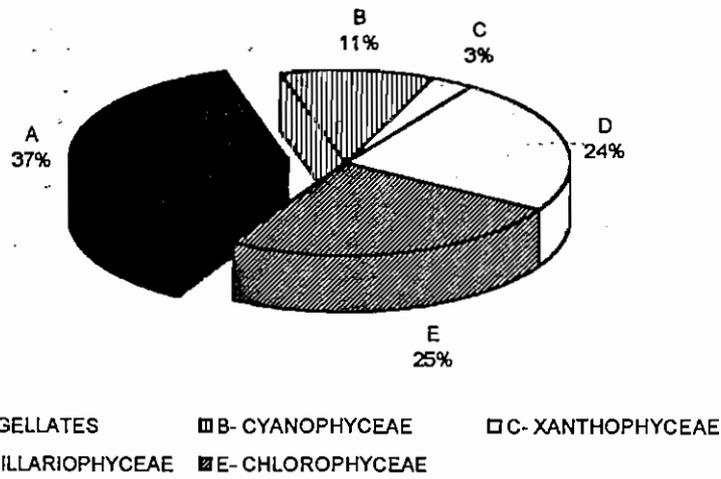


Figure 1. Phytoplankton species richness (relative proportion of taxa) in Barra Lagoon, 1990-1993.

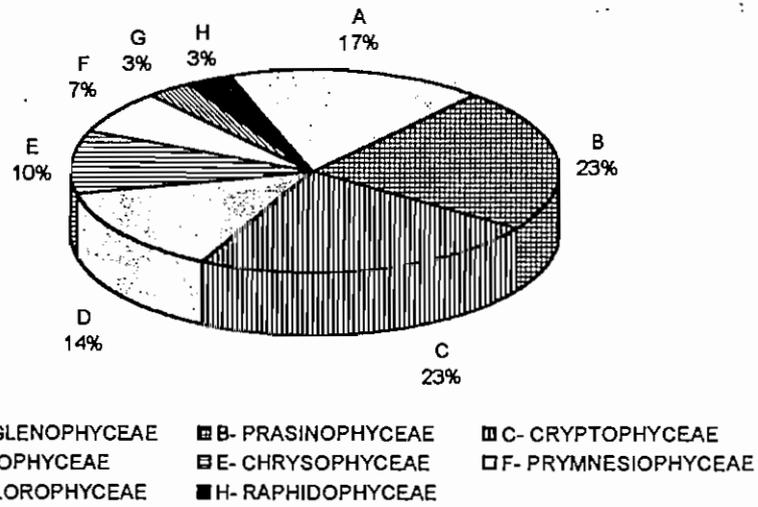


Figure 2. Phytoflagellate species richness (relative proportion of taxa) in Barra Lagoon, 1990-1993.

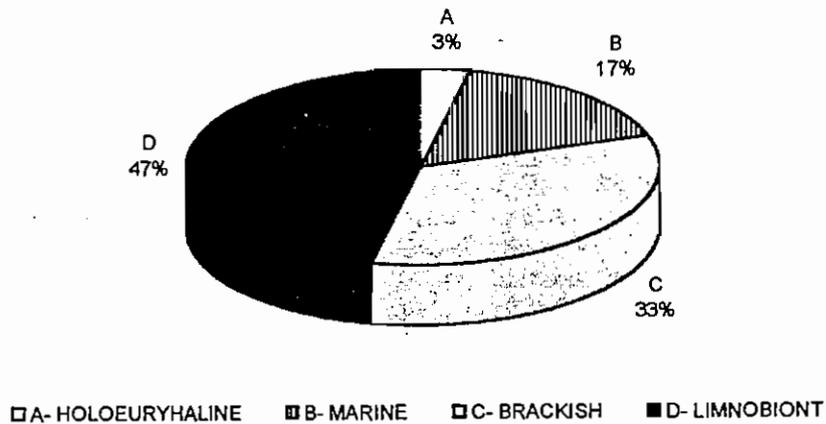


Figure 3. Tolerance of phytoflagellates to salinity.

Pyramimonas grossii Parke, *Pseudoscourfieldia marina* (Thronsen) Manton and *Proocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. *Chatonella subsalsa* Biecheler, which had been described from brackish waters, was found in December 1992 and in January 1993.

All phytoflagellate taxa identified have been recorded previously from temperate sites. Of those, eighteen were new records for the Brazilian continental and brackish waters and nine were first records for any tropical location (Menezes & Domingos, 1994). Species descriptions are appended.

Euglenophyceae

Euglenales

Eutreptiaceae

Eutreptia viridis Perty. Figures 4–6.

Cells 40–53 μm long, 4–9 μm broad, strongly metaboly, fusiform to elliptical, posterior end narrowed in an acute, hyaline caudal process. Pellicule with faint helicoidal stripes. Numerous green chloroplasts, cylindrical to oblong irradiating from a single paramylon center situated in front of the nucleus. Numerous elongated ovoid paramylon grains, frequently closed in the central region where the plastidome converges. Nucleus oblong in the posterior part of cell; stigma elliptical, conspicuous. Two subequal flagella, heterodynamic, about 1–1.5 times cell length. Distribution: Coastal; cosmopolitan.

Euglena proxima Euglenaceae Dangeard. Figure 7.

Cells 53–62 μm long, 9–12 μm broad, metabolic, elliptical to slightly obovoid, posterior end rounded. Pellicule with faint helicoidal stripes. Numerous discoid green chloroplasts. Elongated paramylon grains scant. Nucleus elliptical in the cell middle; stigma small. Flagellum about 0.5–0.7 times cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Phacus longicauda (Ehrenberg.) Dujardin. Figure 8.

Cells 92–96 μm long, 28–32 μm broad, flattened, heart-shaped, posterior end narrowed in a long hyaline caudal process (45–49 μm long). Pellicule with longitudinal stripes. Numerous discoid green chloroplasts. Two rounded concentric paramylon grains approximately in the middle cell part. Stigma has not been observed. Flagellum about 0.3–0.5 times cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Strombomonas verrucosa (Daday) Deflandre. Figures 9–10.

Lorica 35–39 μm long, 17–23 μm broad, trapezoidal,

anterior end with a wide collar (4–6 μm broad), sides slightly undulated, posterior end tapered to a conical caudal process (9–12 μm long) separated from main lorica body by a transversal septum. Wall thick, yellowish to dark brown, rough and with adhering particles on its surface. Numerous discoid green chloroplasts, without pyrenoid. Paramylon rod-shaped or discoid. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Trachelomonas volvocina Ehrenberg. var. *volvocina*. Figures 11–12.

Lorica 9–12 μm diameter, spherical, pore with ring thickening. Wall reddish-brown, smooth. Two parietal elongated green chloroplasts, each with an inner pyrenoid. Stigma small, elliptical. Flagellum 1.5–2 times diameter of the lorica. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Cryptophyceae

Cryptomonadales

Planonephraceae

Hemiselmis simplex Butcher. Figures 13–17.

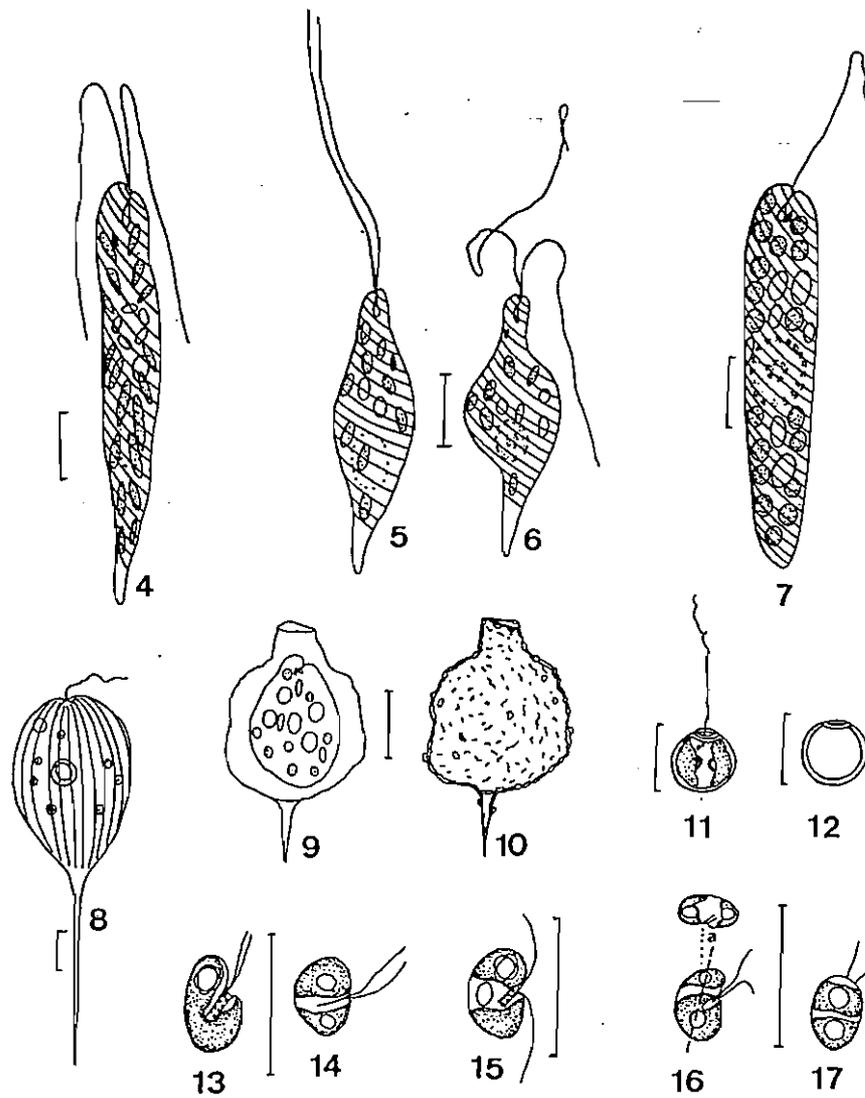
Cells 4–9 μm long, 3–4 μm broad, 3–4 μm thick, strongly metabolic, asymmetrical, flattened laterally, elliptical to reniform in lateral view, rounded poles, anterior end more straight than posterior, convex ventral margin with central depression. Gullet extends obliquely from a ventral depression to the central cell dividing it into two slightly symmetrical parts. Two rows of ejectisomes. One green chloroplast, parietal, with an anterior pyrenoid, occasionally two chloroplasts, each with a pyrenoid. Sometimes a spherical starch grain in the posterior part of cell. Flagella laterally inserted which extend forwards when the cell is in rest, 0.5–1.5 times cell length. Distribution: Coastal; Europe, Japan, Brazil.

Cryptomonadaceae

Komma acuta (Utermöhl) Hill. Figures 18–19.

Cells 6–8 μm long, 3.8–5 μm broad, 3.5–4 μm thick, dorsiventrally compressed, obovoid in lateral, ventral and dorsal views, ventral and dorsal margins convex, the convex ventral margin to about 2/3 of cell length, posterior end conical narrowed in a curved hyaline tip. Gullet extending straightly about 2/3 of the cell length. Two rows of ejectisomes. A dorsal blue chloroplast with a central pyrenoid. Flagella 0.6 times to about cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Chroomonas salina (Wislouch) Butcher. Figures 20–21.



Figures 4-6. *Eutreptia viridis*. Figure 7. *Euglena proxima*. Figure 8. *Phacus longicauda*. Figures 9-10. *Strombomonas verrucosa*. Figures 11-12. *Trachelomonas volvocina* var. *volvocino*. Figures 13-17. *Hemiselmis simplex*. 14. Cross section. 15. Dorsal view. Scales = 10 μm .

Cells 15-18 μm long, 7.5-8.3 μm broad, 8.2-9 μm thick, obovoid, slightly compressed, dorsal margin convex, ventral margin straight, posterior end narrowed to a rounded tip. Gullet extends obliquely about 1/2 of cell. Two or three rows of ejectisomes. A yellow-olive parietal chloroplast, margins lobed with a central pyrenoid. Flagella about cell length. Distribution: Coastal; cosmopolitan.

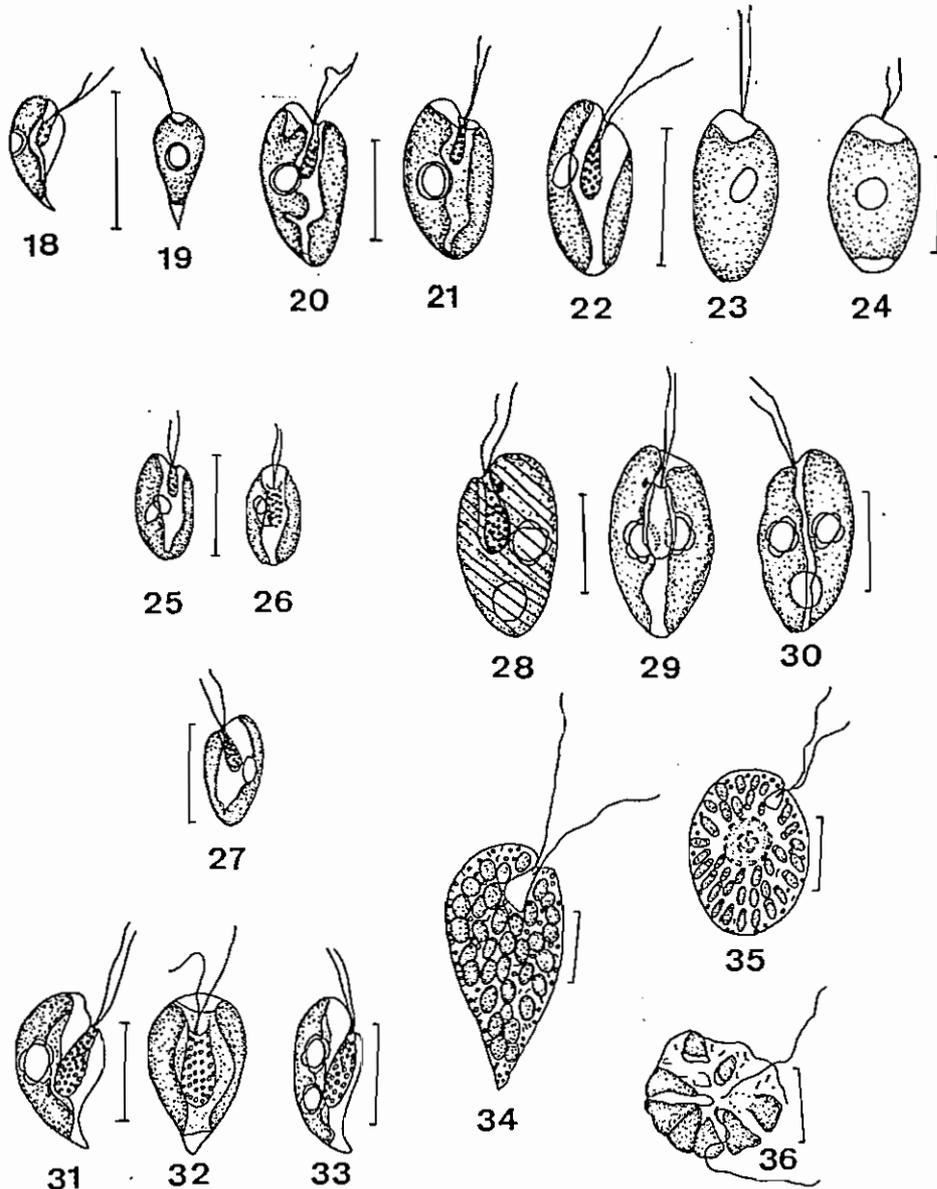
Cryptomonas erosa Ehrenberg. Figures 22-24.

Cells 10-15 μm long, 4.5-7 μm broad, 4-6 μm thick, laterally flattened, obovoid to elliptical in lateral, ven-

tral and dorsal views, poles rounded. Gullet extends straightly about 1/2 of cell length. Five to six rows of ejectisomes. Two dorso-laterally olive chloroplasts. An elliptical Corps de Maupas laterodorsally. Flagella 0.6 times to about cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Cryptomonas phaseolus Skuja. Figures 25-27.

Cells 18-20 μm long, 8-10 μm broad, 8-10 μm thick, dorsiventrally flattened, obovoid in lateral view, elliptical in ventral and dorsal views, convex margins, posterior end rounded. Gullet extends obliquely about 1/2

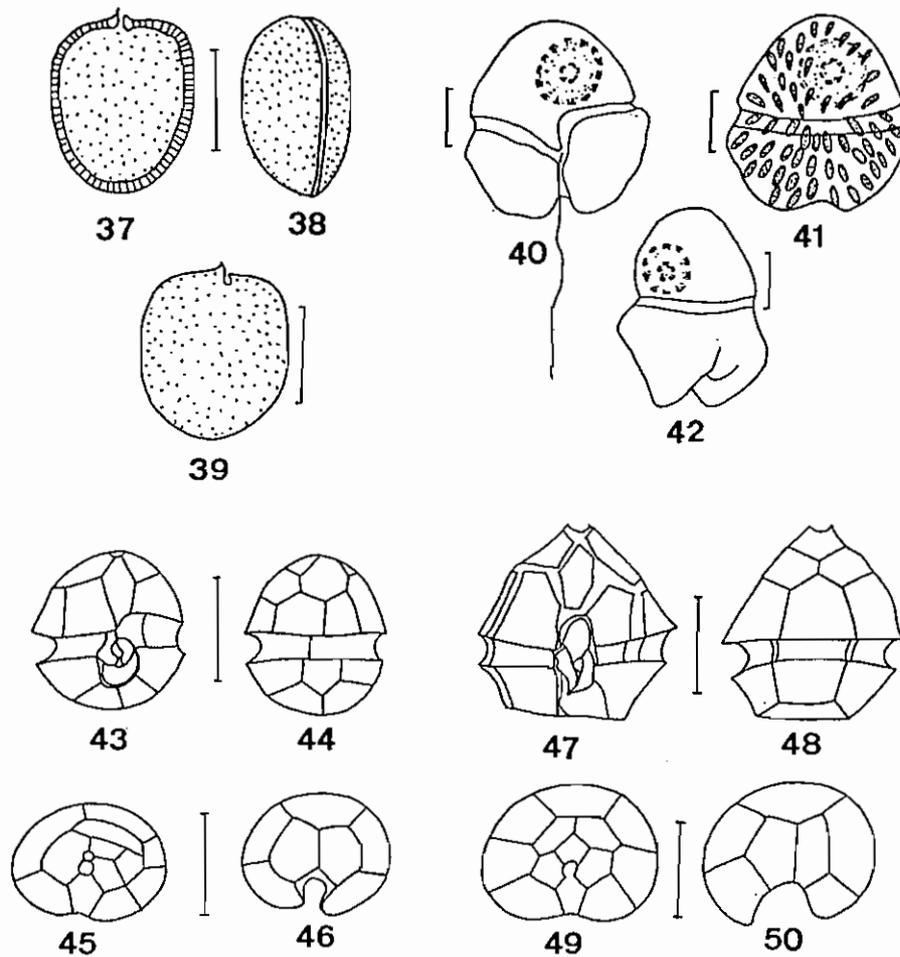


Figures 18–19. *Komma acuta*. 19. Dorsal view. Figures 20–21. *Chroomonas salina*. Figures 22–24. *Cryptomonas erosa*. 23–24. Dorsal view. Figures 25–27. *Cryptomonas phaseolus*. 26. Ventral view. Figures 28–30. *Cryptomonas stigmatica*. 29. Ventral view. 30. Dorsal view. Figures 31–33. *Teleaulax acuta*. 32. Ventral view. Figures 34–36. *Chattonella subsalsa*. 36. Cell after fixation with lugol. Scales = 10 μ m.

of cell length. Four to five rows of ejectisomes. Two lateral olive chloroplasts. Two oblong Corps de Maupas. Flagella about 0.5 times cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Cryptomonas stigmatica Wislouch. Figures 28–30. Cells 18–21 μ m long, 9–10 μ m broad, 8–9 μ m thick, laterally flattened, obovoid in lateral, ventral and dor-

sal views, ventral and dorsal margins convex, posterior end rounded. Periplast with faintly helicoidal stripes. Gullet extends straightly about 1/2 cell length. Five to six rows of ejectisomes. Two lateral olive chloroplasts, each with a pyrenoid surrounded by a sheath of 3–4 starch grains. A basal starch grain. Stigma elliptical, conspicuous. Flagella about cell length. Distribution: Coastal; cosmopolitan.



Figures 37-39. *Prorocentrum minimum*. Figures 40-42. *Gymnodinium sanguineum*. 40. Ventral view. 41 Dorsal view. 42. Laterodorsally view. Figures 43-46. *Durinskia baltica*. 43. Ventral view. 44. Dorsal view. 45. Apical view of epitheca. 46. Apical view of hypotheca. Figures 47-50. *Peridinium umbonatum*. 47. Ventral view. 48. Dorsal view. 49. Apical view of epitheca. 50. Apical view of hypotheca. Scales = 10 μm .

Teleaulax acuta (Butcher) Hill. Figures 31-33.

Cells 16-18 μm long, 8-10 μm broad, 6-9 μm thick, flattened laterally, obovoid in lateral and ventral views, elliptical in dorsal view, convex ventral margin to about 2/3 of cell length, posterior end narrowed to an acute blunt short hyaline curved tail. Gullet extends obliquely, longer than 1/2 of cell length. Four to five rows of ejectisomes. A brown dorsal chloroplast with a central pyrenoid surrounded by a sheath of 3-4 cup shaped starch grains, sometimes two chloroplasts, each with a pyrenoid. Flagella about cell length. Distribution: Coastal, off-shore; England, Norway, Denmark, Japan, Brazil.

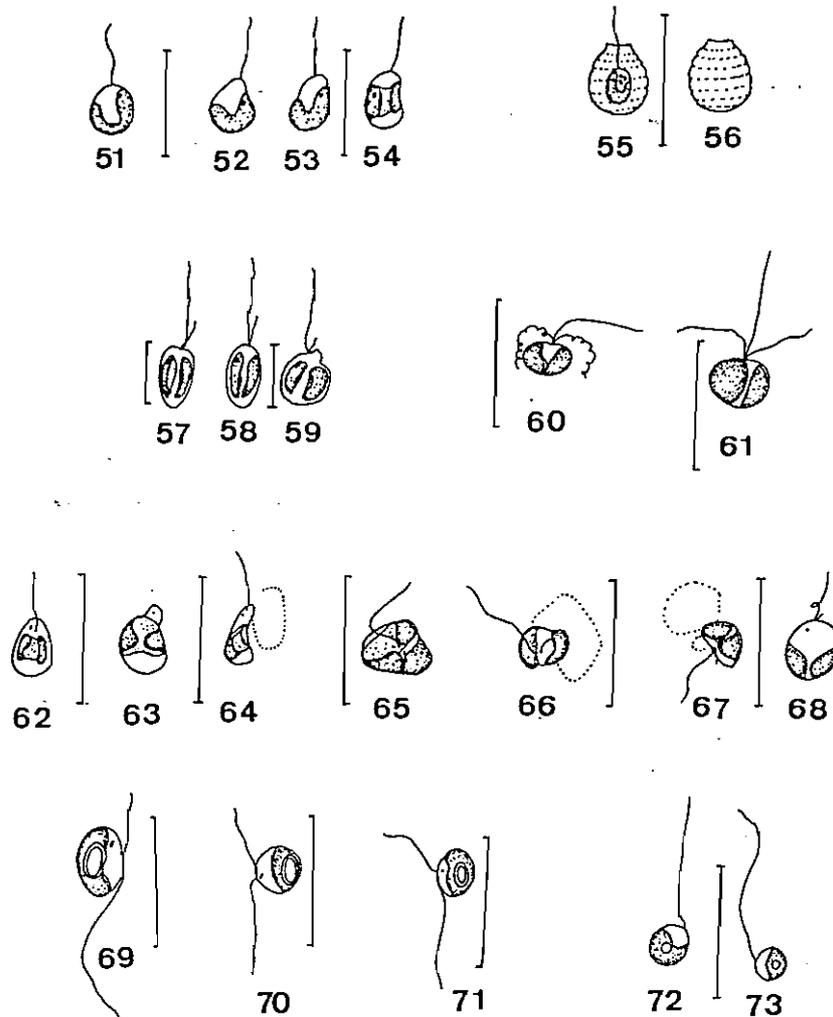
Raphidophyceae

Chattonellales

Chattonellaceae

Chattonella subsalsa Biecheler. Figures 34-36.

Cells 28-38 μm long, 14-18 μm broad, very fragile, laterally flattened, obovoid to obpyriform, margins convex or rounded, posterior end frequently narrowed in an acute hyaline tip. Subapical ventral notch extended by an oblique groove. Numerous lenticular yellow-green chloroplasts in the peripheral cytoplasm, each with a pyrenoid. Small refringent lipid globules peripherally situated. A large central nucleus. Numerous elongated mucocysts in the peripheral cytoplasm. Flagella heterodynamic, about 1.5 times cell



Figures 51–54. *Chromulina pygmaea*. Figures 55–56. *Kephyrion ovale*. Figures 57–59. *Ochromonas mutabilis*. Figures 60–61. *Chrysochromulina parva*. Figures 62–68. *Pavlova lutheri*. 64, 66, 67. Cell with periplast separated, spotted line. Figures 69–71. *Nephroselmis minuta*. Figures 72–73. *Pedinomonas minutissima*. Scales = 10 μm .

length, the anterior flagellum undulated, the recurrent flagellum lying in the ventral groove extension. Distribution: Coastal; France, Spain. South India, Brazil.

Dinophyceae

Prorocentrales

Prorocentraceae

Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller. Figures 37–39.

Cells 15–17.5 μm long, 11–15 μm broad, heart-shape to ovoid, anterior end truncated with a weak short spine, posterior end rounded. Theca ornamented

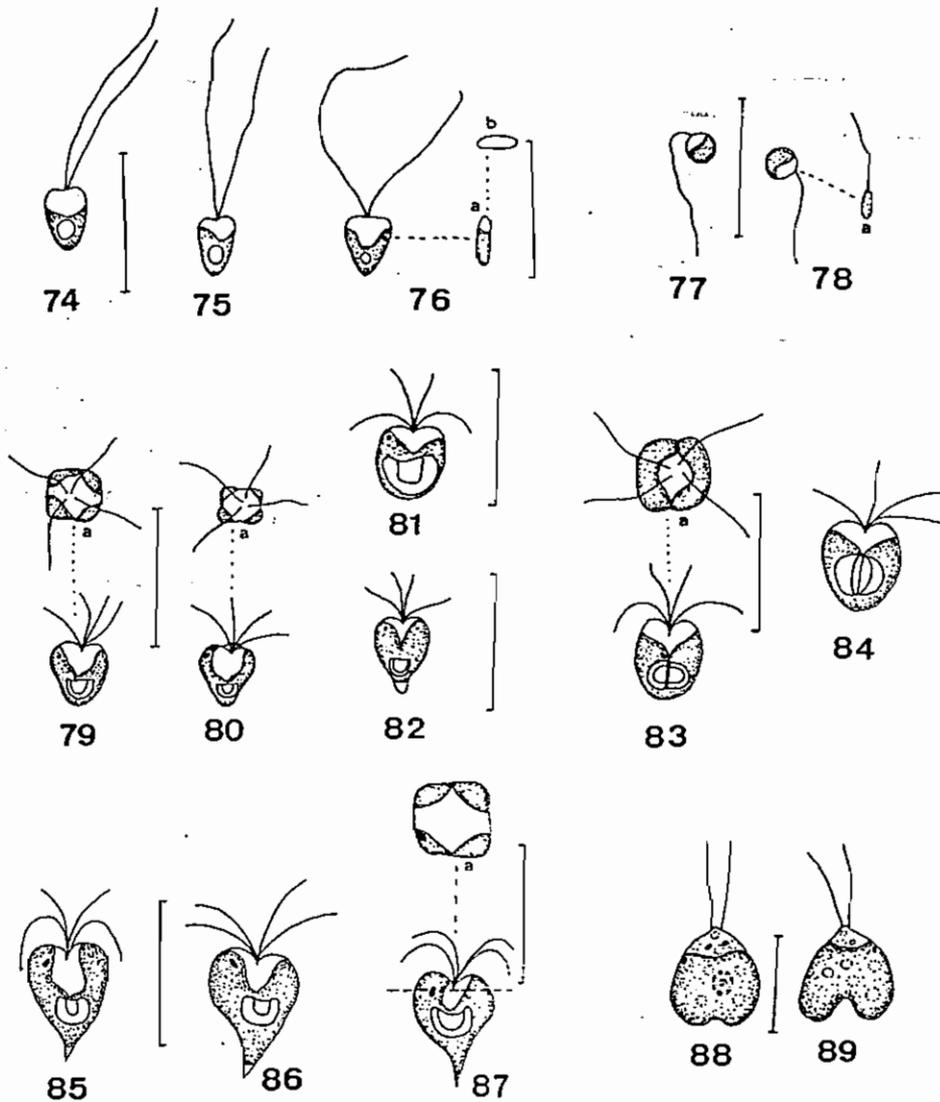
with short spines. Distribution: Coastal, oceanic; cosmopolitan.

Peridinales

Gymnodiniaceae

Gymnodinium sanguineum Hirasaka. Figures 40–42.

Cells 33–36 μm long, 25–33 μm broad, laterally flattened, ovoid. Epicone conical, rounded, hypocone trapezoidal, bilobed. Cingulum large, helicoidal, displaced about 0.2 times cell length. Sulcus does not reach the epicone, deeply notches hypocone. Numerous elongated yellowish green chloroplasts disposed in



Figures 74–76. *Pseudosourfieldia marina*. 76a. Lateral view. 76b. Cross section. Figures 77–78. *Resutor mikron*. 78a. Lateral view. Figures 79–82. *Pyramimonas grossii*. 79a, 80a. Apical view. Figures 83–84. *Pyramimonas orientalis*. 83a. Apical view. Figures 85–87. *Pyramimonas torta*. 87a. Cross section. Figures 88–89. *Selenochloris stigmatophora*. Scales = 10 μ m.

rows. Nucleus large, rounded, in the epicone. Distribution: Coastal, estuarine; cosmopolitan.

Durinskia baltica (Levander) Carty & Cox. Figures 43–46.

Cells 11–17 μ m long, 11–14 μ m broad, ovoid or spherical, slightly flattened dorsiventrally. Epithea slightly larger than hypotheca. Cingulum wide, helicoidal. Sulcus large extending only onto hypotheca and does not reach the antapex, anterior sulcal plate (Sa) absent. Pattern plate asymmetrical, plate 3^l triangular. Plate

with rows of dots faintly visible, sutures striated or not. Plate formula: Po, 2X, 4', 2a, 6''. C5 (C4+T), S4, 5''', 2'''. Distribution: Freshwater, coastal, oceanic; probably cosmopolitan.

Peridinium umbonatum Stein. Figures 47–50.

Cells 19–24 μ m long, 16–19.5 μ m broad, egg-shaped, flattened dorsiventrally. Epithea conical, hypotheca roundish truncate, the former usually larger than the later. Cingulum wide, helicoidal. Sulcus large extending onto both theca and reach the antapex. Pattern plate

symmetrical without visible ornamentation, sutures striated or not. Plate formula: Po, 4', 2a, 7'', C6, S5, 5''', 2'''. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Chrysophyceae

Chromulinales

Chromulinaceae

Chromulina pygmaea Nygaard. Figures 51–54.

Cells 4–4.5 μm long, 3–3.5 μm broad, metabolic, elliptical to ovoid, sometimes rounded. A parietal yellowish chloroplast. No contractile vacuole. Stigma elliptical. Flagellum about the cell length. Distribution: Freshwater; Denmark, Brazil.

Kephyrion ovale (Lackey) Huber-Pestalozzi. Figures 55–56.

Lorica 5–7 μm long, 4–5 μm broad, ovoid to elliptical, anterior end truncated, posterior end rounded. Wall with 5–6 weakly developed transversal thick rings. Protoplasm elliptical. A parietal yellow chloroplast. Sometimes one posterior leucosine grain. Stigma and contractile vacuole have not been observed. Flagellum about the lorica length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Ochromonas mutabilis Klebs. Figures 57–59.

Cells 10–13 μm long, 5–7 μm broad, metabolic, ovoid. Two lateral yellowish chloroplasts. Two contractile anterior vacuole. Stigma elliptical. Unequal flagella, the longest 1–2 times cell length, the short 0.3–0.5 times. Distribution: Freshwater; Europe, Brazil.

Prymnesiophyceae

Prymnesiales

Pavlovales

Pavlovaceae

Chrysochromulina parva Lackey. Figures 60–61.

Cells 4–7 μm diameter, discoid, anterior end flattened with weakly developed depression. Two parietal brownish chloroplasts. Flagella 2–2.5 times cell length, haptonema 1.5 times cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Pavlova lutheri (Droop) Green. Figures 62–68.

Cells 6–7 μm long, 3–3.5 μm broad, strongly metabolic, laterally flattened, elliptical to triangular in front view, sometimes square. Two parietal yellowish to olive chloroplasts. Stigma small, near insertion of flagella. Two unequal flagella, the longer 1.5 times cell length, the shorter 0.1–0.2 times cell length, haptonema very short and rarely observed. Distribution: Coastal; Europe, Brazil.

Prasinophyceae

Pedinomonadales

Pedinomonadaceae

Nephroselmis minuta (N. Carter) Butcher. Figures 69–71.

Cells 3.5–5 μm long, 3–4 μm broad, flattened laterally, outline roundish in front view, sometimes elliptical, anterior end rounded with apical swelling. A green cup-shaped chloroplast, occupying half of the cell. Pyrenoid rounded, basal. Contractile vacuole has not been observed. Stigma small near the insertion of the flagella. Flagella heterodynamic, 1–2 times cell length, the shorter 1–1.5 times as long as cell. Distribution: Coastal; England, Brazil.

Pedinomonas minutissima Skuja. Figures 72–73.

Cells 2.5–5 μm diameter, flattened, discoid. A green cup-shaped chloroplast, occupying nearly the entire cell, with a rounded basal pyrenoid. Stigma faintly visible. Flagellum about cell diameter. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Pseudoscourfieldia marina (Thronsen) Manton. Figures 74–76.

Cells 2.5–5 μm long, 1.7–4.8 μm broad, 1.5 μm thick, laterally flattened, conical to ovoid in front view, anterior end truncated with an apical depression, posterior end rounded. A green-yellowish cup-shaped chloroplast, occupying nearly the entire cell, with a rounded basal pyrenoid. Contractile vacuole and stigma lacking. Flagella homodynamic, 2–4 times cell length. Distribution: Coastal, oceanic; Europe, Brazil.

Resultor mikron (Thronsen) Moestrup. Figures 77–78.

Cells 1.5–2 μm diameter, flattened, discoid. A green cup-shaped chloroplast, occupying nearly the entire cell, without pyrenoid. Contractile vacuole and stigma have not been observed. Flagellum straight or curvate about 10 times cell diameter. Distribution: Coastal; Finland, Japan, Brazil.

Pyramimonadales

Pyramimonadaceae

Pyramimonas grossii Parke. Figures 79–82.

Cells 4.5–10 μm long, 3–6 μm broad, 3–5 μm thick, obovoid or pyramidal, quadrangular in apical view, anterior end truncated with 4 equal lobes weakly developed surrounding a central depression, posterior end rounded sometimes narrowed to a rounded tip. A green

urn-shaped chloroplast, 4-lobed, corresponding to the 4 periplast lobes. Pyrenoid cup-shaped, basal surrounded by a starch sheath. One or two contractile vacuoles near the insertion of flagella. Stigma small in the anterior cell part. Flagella homodynamic, 0.6–1 times cell length arising from the base of the apical depression. Distribution: Coastal, oceanic; probably cosmopolitan.

Pyramimonas orientalis Butcher. Figures 83–84.

Cells 6–7 μm long, 4.5–6 μm broad, obovoid, anterior end truncated with 4 equal lobes, weakly developed, quadrangular with rounded angles in apical view, posterior end bluntly rounded. A green urn-shaped chloroplast with 2 lobes. Pyrenoid rounded, basal, surrounded by a sheath of two cup-shaped starch grains. Contractile vacuole has not been observed. Stigma absent. Flagella as long as the cell. Distribution: Coastal; world-wide.

Pyramimonas torta Conrad & Kufferath. Figures 85–87.

Cells 5.5–9 μm long, 4.7 μm broad, 4.5–5.5 μm thick, heart-shaped, anterior end truncated with 4 lobes weakly developed, surrounding the central depression, quadrangular with rounded angles in apical view, posterior end narrowed to a hyaline acute tip. A green urn-shaped chloroplast with 4 lobes. Pyrenoid cup-shaped surrounded by a starch sheath. Contractile vacuole has not been observed. Stigma elliptical, in the anterior cell part. Flagella as long as the cell. Distribution: Coastal; Belgium, Brazil.

Chlorophyceae

Chlamydomonadales

Chlamydomonadaceae

Selenochloris stigmatophora (Korsikov) Ettl. Figures 88–89.

Cells 10–12 μm long, 7–9 μm broad, lunate with short anterior papilla. A yellowish green faintly urn-shaped chloroplast. Pyrenoid lacking. Numerous contractile vacuole dispersed in the cytoplasm. Stigma small, in the anterior cell part. Flagella about the cell length. Distribution: Freshwater; cosmopolitan.

Seasonality of selected phytoflagellate species

Over the three years as a whole, the phytoplankton abundance showed a relatively weak seasonality (Domingos, unpublished data). The phytoplankton biovolume (Figure 90) was characterized by a

greater contribution of Cyanophyceae (average 39%) and Dinophyceae (average 28%) followed by Bacillariophyceae (average 10%), Chlorococcales (average 7%) and Prasinophyceae (average 6%). The other algal classes did not contribute significantly to the total biovolume. However, if the phytoflagellates are expressed as a distinct biological group, they were quantitatively the most important in the phytoplankton biovolume (average 44%) (Figure 91). Among the phytoflagellates (Figure 92), the dominating class was the Dinophyceae. Raphidophyceae, exclusively represented by *Chattonella subsalsa*, and Euglenophyceae with *Eutreptia viridis* and *Euglena proxima* were the classes which contributed less. All other remaining classes contributed between 4% and 14% to the total phytoflagellate biovolume. Species of Prasinophyceae (*Pyramimonas grossii*, *P. orientalis* and *Pedinomonas minutissima*) and Cryptophyceae (*Hemiselmis simplex*) were the most abundant ones.

The event of a mass fish-kill (*Brevoortia tyrannus*-filter) in summer (February 1991) due to the production of toxins by *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (Azevedo et al. 1994) resulted in high ammonia input to the water column as a consequence of the fish decomposition. The increase in ammonia concentration resulted in drastic decline of Cyanophyceae biovolume, whereas the proportion of Chlorococcales largely increased. Phytoflagellates and the other classes did not contribute significantly (Domingos et al., 1994).

During the development of the macroalgal stand (September–December 1992) phytoflagellates dominated the total phytoplankton biovolume, especially *Gymnodinium sanguineum* (Domingos, unpublished data)

Table 2 shows some of the abiotic variables values from Barra Lagoon, at the times of peak phytoflagellate biomass in the three years. In general, there is no strong seasonal pattern to which any conforms (Figure 93), although *Pavlova lutheri* showed some slight recurrence each summer. *Pyramimonas grossii* and *P. orientalis* often co-occurred with peaks at the beginning of the study period.

Numerous small flagellates exhibited their highest peaks at the beginning of the period, before the fish-kill, when the transparency of water was low (0.3m). The larger species, such as *Gymnodinium sanguineum*, *Chattonella subsalsa*, *Durinskia baltica* and *Eutreptia viridis* had the maximum peak towards the end of the period, during the development of macroalgal phase when transparency was greatest and light could penetrate through the entire water column. With the

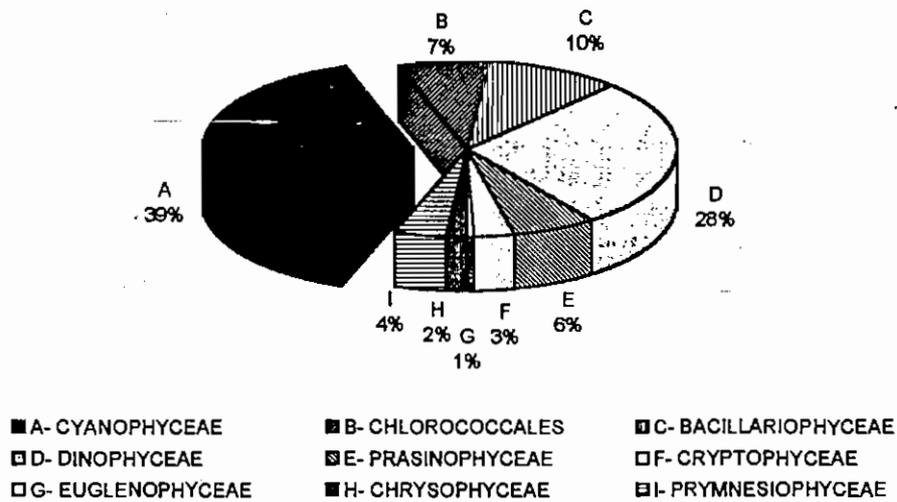


Figure 90. Percentage contribution of different taxonomic groups to total biovolume (average of three years).

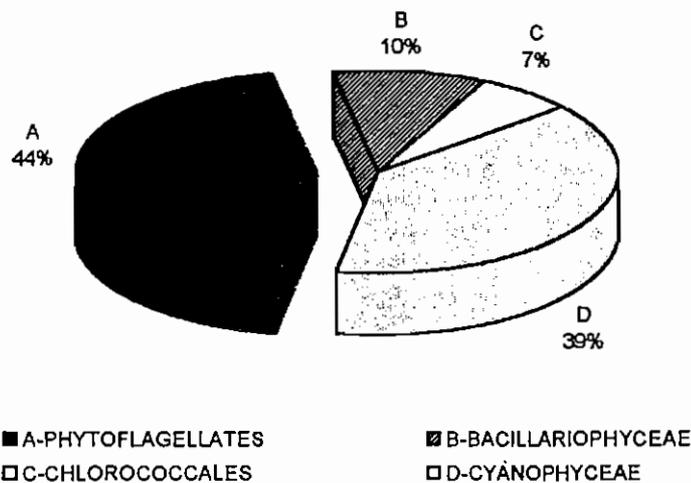


Figure 91. Percentage contribution of phytoflagellates as a whole to total biovolume (average of three years).

exception of *G. sanguineum*, all other species were less abundant. *Pavlova lutheri* and *Kephyrion ovale* belong to the group of abundant small species which showed maximum biovolume in this later period. Table 3 shows the mean selected species biovolume during all study periods.

No statistically significant correlation between phytoflagellate biovolume and either ammonia, DOM or dissolved inorganic nutrients was found. A direct correlation was observed between DOP and *Euglena proxima* ($r=+0.37$) and *Cryptomonas erosa* ($r=+0.43$). Salinity and *Pyramimonas orientalis* ($r=-0.43$) and *P. grossii* ($r=-0.46$) were inversely related. These species were correlated with each other and

they also showed inverse correlation with transparency (Secchi disk depth) ($r=-0.42$ and -0.37 , respectively). *Gymnodinium sanguineum* presented closely direct correlation ($r=+0.40$) with turbidity. *Pavlova lutheri* had an inverse correlation with depth ($r=-0.40$). *Pyramimonas grossii* was the only phytoflagellate species which showed significant inverse correlation ($r=-0.37$) with TN:TP ratio.

Discussion

The floristic composition of the phytoplankton of Bar-ra Lagoon was characterized by a small number (81)

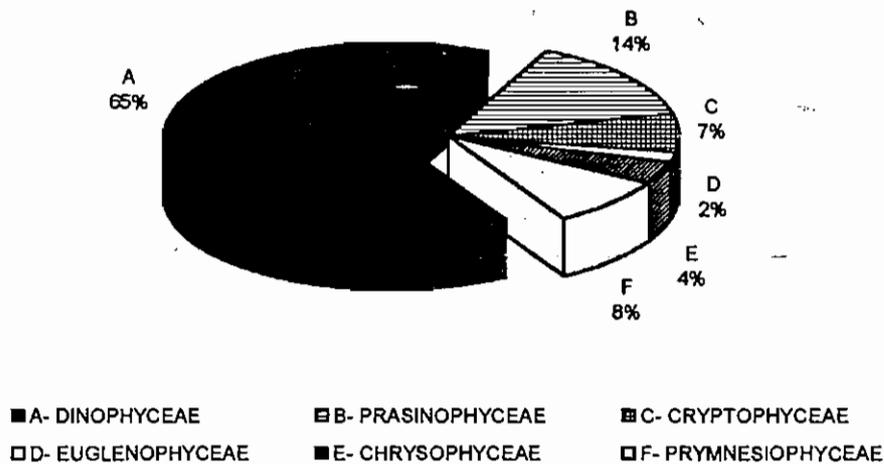


Figure 92. Percentage contribution of different biovolume phytoflagellate classes (average of three years).

Table 2. Some abiotic variables measured at the peak growth of fourteen selected phytoflagellate species

	Date	S‰	pH	NH ₄ μg l ⁻¹	TN mg l ⁻¹	TP μg l ⁻¹	DOM mg l ⁻¹
<i>Eutreptia viridis</i>	15/06/93	9.8	8.7	22.7	1.1	48.8	6.6
<i>Euglena proxima</i>	24/02/92	8.1	8.9	14.0	3.0	515.2	15.4
<i>Hemiselmis simplex</i>	26/03/91	6.5	8.4	30.8	1.9	184.7	14.2
<i>Cryptomonas erosa</i>	24/02/92	8.1	8.9	14.0	3.0	515.2	15.4
<i>Chattonella subsalsa</i>	12/01/93	7.1	8.4	26.6	1.9	129.3	10.7
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	01/12/92	6.9	9.3	30.9	1.5	72.1	9.1
<i>Durinskia baltica</i>	09/03/93	9.7	8.5	26.9	1.3	95.5	5.5
<i>Kephyrion ovale</i>	28/10/92	9.5	8.5	26.4	1.6	57.0	12.5
<i>Ochromonas mutabilis</i>	29/04/91	3.8	8.5	18.2	1.2	196.7	18.8
<i>Pavlova lutheri</i>	16/03/93	10.1	8.5	68.0	1.8	152.5	10.0
<i>Pedinomonas minutissima</i>	15/11/90	3.1	9.3	7.0	2.4	137.5	16.2
<i>Pseudosourfieldia marina</i>	06/12/90	3.9	9.3	15.4	2.5	168.5	19.7
<i>Pyramimonas grossii</i>	29/04/91	3.8	8.5	18.2	1.2	196.7	18.8
<i>Pyramimonas orientalis</i>	09/04/91	3.2	9.1	14.0	1.2	172.0	7.6

of taxa, when compared to marine and freshwater environments, and by species drawn from freshwater, brackish, marine and holoeuryhaline primary habitats (Menezes & Domingos, 1994). The low number of taxa is common in continental brackish lakes (Caljon, 1983). In the case of Barra Lagoon, the indirect connection to the sea is possibly critical.

The phytoflagellate assemblage and the other planktonic non-flagellates observed in Barra Lagoon clearly reflect the influence of salinity on the specific composition. The low salinity with weak fluctuation (3–8‰ and mean value 5.4‰) over the three years of study favoured a higher number of limnobionts, although the majority of these taxa are

classified as weakly euryhaline limnobionts (Caljon, 1983). This is compounded by their sporadic or rare occurrence and their quantitatively insignificant contribution. Although a relatively large species number (eleven) of limnobiontic phytoflagellates have been recorded, the quantitative contribution represented by salinity-tolerant organisms which may tolerate low salinity, was slight, some do occur in abundance in dilute brackish waters: *Euglena proxima*, *Cryptomonas erosa*, *Ochromonas mutabilis*, *Kephyrion ovale* and *Pedinomonas minutissima*. Coastal species were the richest taxonomic groups and they also showed a higher frequency and abundance; some are typical of brackish waters (*Pyramimonas grossii*, *P.*

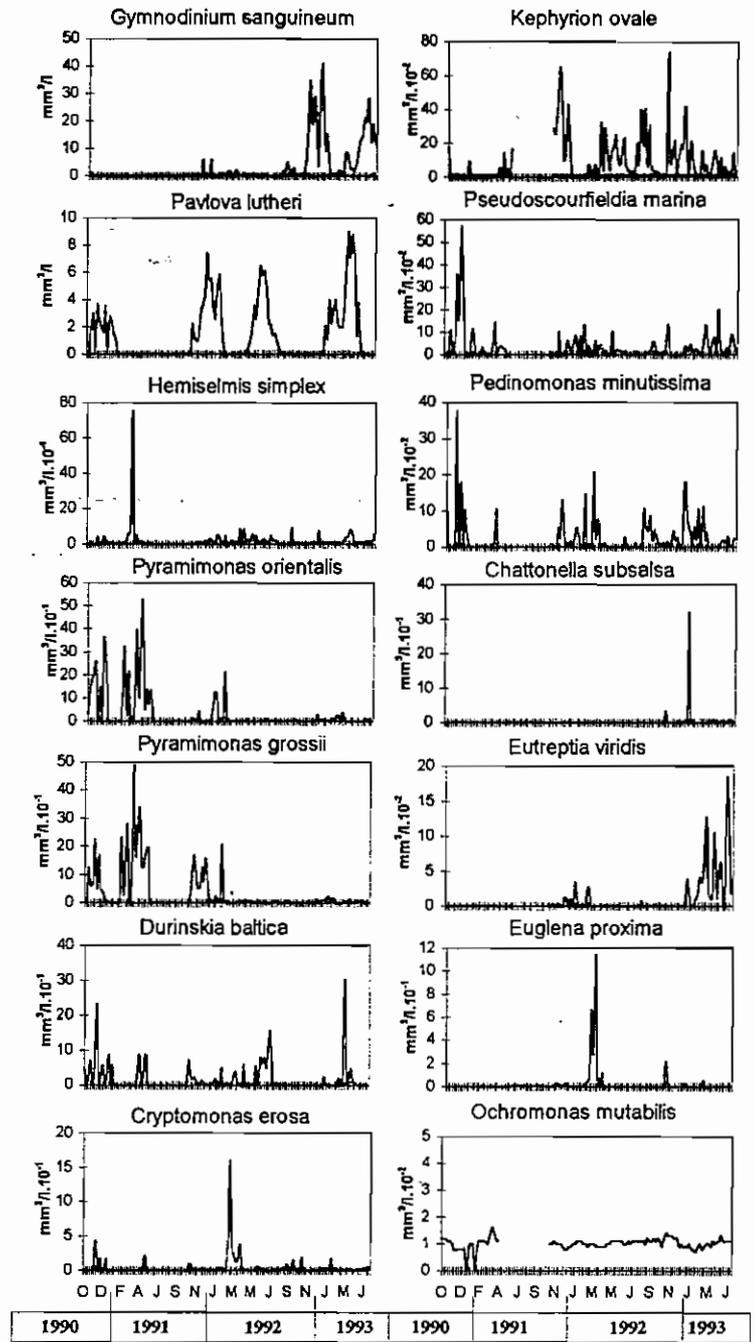


Figure 93. Biovolume seasonality of the fourteen selected phytoflagellate species in Barra Lagoon, 1990–1993.

orientalis, *Hemiselmis simplex*, *Gymnodinium sanguineum*), others of marine waters (*Pavlova lutheri*, *Pseudosourfieldia marina*). This latter group occurs in marine littoral areas with a somewhat reduced salin-

ity but with good development in brackish waters. Besides *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, other typically brackish non-flagellate species were frequent in Barra Lagoon, among them: *Oocystis submarina*

Table 3. Biovolume averages of fourteen selected phytoflagellate species, 1990–1993

	Length × width (μm)	Biovolume (μm^3)	Standard deviation	<i>n</i>
<i>Eutreptia viridis</i>	30.0 × 9.5	1483.0	2.2	20
<i>Euglena proxima</i>	49.0 × 11.0	2925.0	1.4	20
<i>Hemiselmis simplex</i>	8.9 × 4.2	53.5	0.6	35
<i>Cryptomonas erosa</i>	14.0 × 7.2	477.5	0.5	30
<i>Chottonella subsalsa</i>	29.2 × 15.0	653.0	4.7	10
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	35.0 × 26.0	6800.0	3.0	27
<i>Durinskio baltica</i>	12.1 × 10.8	647.8	1.5	25
<i>Kephyrion ovale</i>	5.4 × 4.8	18.0	2.1	25
<i>Ochromonas mutabilis</i>	11.2 × 5.5	88.5	2.1	20
<i>Pavlova lutheri</i>	4.5 × 2.7	23.5	0.6	29
<i>Pedinomonas minutissima</i>	4.0 × 3.5	19.5	0.3	30
<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	4.0 × 2.8	20.5	2.3	25
<i>Pyramimonas grössii</i>	5.0 × 4.5	99.0	1.3	35
<i>Pyramimonas orientalis</i>	6.7 × 5.1	165.0	0.6	40

Lagerheim (Chlorococcales), *Actinocyclus normanii* (Gregory) Hustedt f. *subsalsa* (Juhl-Dannf) Hustedt, *Chaetoceros muellerii* Lemmermann and *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith (Bacillariophyceae) (Menezes & Domingos, 1994).

From a biogeographic point of view, the presence and abundance of phytoflagellate taxa previously recorded only from temperate areas (*Hemiselmis simplex*, *Teleaulax acuta*, *Ochromonas mutabilis*, *Chromulina pygmaea*, *Pavlova lutheri*, *Nephroselmis minuta*, *Resultor mikron*, *Pseudoscourfieldia marina*, *Pyramimonas torta*) is interesting. But for *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher & Swale var. *africana* Hindák (Chlorococcales), none of the remaining non-flagellate taxa from Barra Lagoon, is restricted to the tropics (Menezes & Domingos, 1994), suggesting that the flora is cosmopolitan.

Comparing the taxonomic composition and biomass results with available data from literature, the more frequent and/or abundant phytoflagellates identified here have been recorded from other hypertrophic brackish environments (Domingos, 1991; Romo & Miracle, 1994) and from coastal polluted areas (Thronsen, 1969).

Although there are few studies on the abundance of phytoflagellates under richer trophic conditions, features such as motility and varied trophic behaviour have been suggested to confer competitive advantages to these algae in organic matter-rich environments (Porter, 1990; Rojo & Alvarez-Cobelas, 1993). Particularly in relation to nutritional requirements, Alvarez-

Cobelas & Jacobsen (1992) proposed a diagram based upon the dominant phytoplankton biomass, which related phytoflagellate increase in hypertrophic environments to the ammonia- and DOM-content, including brackish coastal lagoons.

The lack of correlation between phytoflagellates biovolume and ammonia, DOM and dissolved inorganic nutrients may demonstrate that these resource concentrations were not the main factors for the phytoflagellate composition and abundance in Barra Lagoon. The high temperatures in tropical environments and the usually shallow depth of coastal lagoons contribute to high and fast organic matter recycling. In the Barra Lagoon, up to 70% of the primary production is sustained by recycling of organic matter in the water column (Carmouze et al. 1994a); such recycling leaves a low content of dissolved inorganic nutrients.

Taking into account that pigmented flagellates contributed 44% of the total phytoplankton biovolume over the three years of study, mixotrophic behavior is a likely explanation for the maintenance of the phytoflagellate populations in Barra Lagoon. Many phytoflagellate species identified appear to be mixotrophic (Porter, 1988; Jones, 1997) and, although there is a high dissolved organic matter content in Barra Lagoon (Carmouze et al., 1994b), the lack of correlation between DOM and phytoflagellates could support the idea that the mixotrophic algae are poor competitors for dissolved nutrients, as pointed out by Holen & Boraas (1995).

The maximal biovolume of pigmented flagellates with predominance of larger cells during the development of benthic macroalgae might be attributable to the alternative source of nutrients made possible through phagotrophy (bacterivory?). Although shallow (1 m at the collecting station), the benthic macroalgae stand affects the vertical heterogeneity of nutrient availability, while resources in the water column are shared with growing macroalgae. This is supported by the low planktonic biomass verified on this occasion (Domingos, unpublished data).

The dominance of *Gymnodinium sanguineum*, a large mixotrophic species, might be favoured by swimming velocity and displacement amplitude towards the bottom for nutrient uptake, clearly demonstrated by its closely positive relation with water transparency, which reached maximal values during the development of macroalgae stand. Motility is an advantage of acquisition of particles by phagotrophic planktonic algae (Fenchel, 1982; Raven, 1995) and because swimming velocity increases with algal size (Sommer, 1988), larger cells offer a larger boundary surrounding them facilitating particle ingestion (Raven, 1995).

The abundance of larger cells during the development of macroalgae stand at the latter period of study contrasts with that observed at the beginning of study. In the latter there was a dominance of generally smaller species which, in addition to their mixotrophic behaviour, were probably favoured by low water transparency, as demonstrated by inverse correlation between *Pyramimonas grossii* and *P. orientalis* and Secchi depth. The contrast between the peak of larger flagellates during the highest transparency versus the peak of smaller cells during the lowest water transparency is in agreement with the literature. Sommer (1988) and Jones & Ilmavirta (1988) pointed out that there is selective advantage for larger flagellates in heterogeneous environments while the smaller cells have ability to exploit homogeneous conditions.

The lack of seasonal dynamics for both phytoflagellates and other planktonic algae was expected (Domingos, unpublished data). The irregular pattern of phytoplankton seasonality is common in shallow lakes (Reynolds et al., 1994), particularly in tropical environments, where the succession is frequently affected by abrupt events (Melack, 1979).

It seems that, in Barra Lagoon, the main factors driving abundance and occurrence of planktonic phytoflagellates are water transparency, the distribution of nutrients in the water column and nutritional sources. However, there is little information available

on the environmental requirements of phytoflagellates in brackish tropical ecosystems under hypertrophic conditions. More accurate investigations are required to evaluate potential nutritional resources of the phototrophic flagellates in Barra Lagoon.

Our results support different physiological or behavioral phytoflagellate responses to environmental factors (Jones & Ilmavirta, 1988) and the importance of taxonomy for a better understanding of the occurrence and the dynamics of this biological group, especially in tropical brackish ecosystems with high trophic status.

On the other hand, major information about the interactions between natural populations of organisms and their environment will contribute, undoubtedly, to a better understanding in the taxonomic studies. The similar ecological requirements and dynamics observed between *Pyramimonas grossii* and *P. orientalis* and their morphological similarity under light microscopy suggest that the species are closely related, although an electron microscopy examination of the material will be necessary in order to make a more reliable identification.

Acknowledgements

We thank Dr Jean-Pierre Carmouze for his essential support during the field and laboratory work and his suggestions to the manuscript. We also want to thank two anonymous referees for critically reading the manuscript and for revising the English language. This study was supported by ORSTOM, CNPq and FUJB-UFRJ.

References

- Alvarez-Cobelas, M. & B. A. Jacobsen, 1992. Hypertrophic phytoplankton: an overview. *Freshwat. Forum* 2: 184-199.
- Azevedo, S. M. F. O. & J-P. Carmouze, 1994. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophycées. Coïncidence ou conséquence?. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 265-272.
- Caljon, A. G., 1983. Brackish-water phytoplankton of the Flemish lowland. *Dev. Hydrobiol.* 48: 1-272.
- Carmouze, J-P., B. Farias & P. Domingos, 1994a. Evolution du metabolisme d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poisson. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 199-215.
- Carmouze, J-P., C. D'Elia Sampaio & P. Domingos, 1994b. Evolution des pools de matière organique et des nutriments dans une lagune tropicale (Brésil) aux cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 217-234.

- Carmouze, J.-P., M. Bernardes & P. Domingos. 1995. Asphyxie des lagunes cotières de l'état de Rio de Janeiro. *ORSTOM Actualités* 46: 23-26.
- Domingos, P. 1991. Estrutura da comunidade fitoplanctônica e produção primária na lagoa de Saquarema. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado em Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 155 pp.
- Domingos, P., V. L. M. Huszar & J. P. Carmouze. 1994. Composition et biomasse du phytoplancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poisson. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 235-250.
- Edler, L. (ed.), 1979. Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea. *Phytoplankton and chlorophyll*. 38p. (UNESCO), Working Group 11, Baltic Marine Biologists.
- Fenchel, T., 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. I. Some important forms and their functional morphology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8: 211-223.
- Holen, D. A. & M. E. Boraas. 1995. Mixotrophy in chrysophytes. In C. D. Sandgren, J. P. Smol & J. Kristiansen (eds). *Chrysophyte algae: ecology, phylogeny and development*. Cambridge University Press: 119-140.
- Huszar, V. L. M. & L. H. S. Silva. 1992. Estrutura das comunidades de quatro lagoas do litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. *Acta limnol. bras.* 4: 291-314.
- Jones, H. L. J., 1997. A classification of mixotrophic protists based on their behavior. *Freshwat. Biol.* 37: 35-43.
- Jones, R. I. & V. Ilmavirta. 1988. Flagellates in freshwater ecosystems- Concluding remarks. *Hydrobiologia* 161: 271-274.
- Melaek, J. M., 1979. Temporal variability of phytoplankton in tropical lakes. *Oecologia* 44: 1-7.
- Menezes, M., 1994. Fitoflagelados pigmentados de quatro corpos d'água da região sul do Município do Rio de Janeiro. Estado do Rio de Janeiro. Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2v. 701 pp.
- Menezes, M. & P. Domingos. 1994. La flore planctonique d'une lagune tropicale (Brésil). *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 273-297.
- OECD, 1992. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. OECD, Paris.
- Porter, K. G., 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia* 159: 89-97.
- Porter, K. G., 1990. Heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1821-1832.
- Raven, J. A., 1995. Comparative aspects of chrysophyte nutrition with emphasis on carbon, phosphorous and nitrogen. In C. D. Sandgren, J. P. Smol & J. Kristiansen (eds). *Chrysophyte algae: ecology, phylogeny and development*. Cambridge University Press: 95-118.
- Reynolds, C. S., J. Padišák & I. Kóbor, 1994. A localized bloom of *Dinobryon sociale* in Lake Balaton: Some implications for the perception of patchiness and the maintenance of species richness. *Abstracta Bot.* 17: 251-260.
- Rajo, C. & M. Alvarez-Cobelas, 1993. Taxonomy and ecology of phytoplankton in a hypertrophic gravel-pit lake II. Cryptophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae. *Nova Hedwigia* 57: 47-63.
- Romo, S. & R. Miracle, 1994. Population dynamics and ecology of subdominant phytoplankton species in a shallow hypertrophic lake (Albufera of Valencia, Spain). *Hydrobiologia* 273: 37-56.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf, 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in Biological research*. W.H. Freeman and Company, New York. 859 pp.
- Sommer, U., 1988. Some size relationships in phytoflagellate motility. *Hydrobiologia* 161: 125-131.
- Steidinger, K. A. & K. Tangen. 1996. *Dinoflagellates*. In C. R. Tomas (ed.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, California: 387-598.
- Thronsdon, J., 1969. Flagellates of Norwegian coastal waters. *Nytt. Mag. Bot.* 16: 161-216.
- Thronsdon, J., 1993. The planktonic marine flagellates. In C. R. Tomas (ed.), *Marine Phytoplankton. A guide to naked flagellates and coccolithophorids*. Academic Press, California: 1-145.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. int. Ver. Limnol.* 9: 1-38.

First Report of Microcystin Production by Picoplanktonic Cyanobacteria Isolated from a Northeast Brazilian Drinking Water Supply

P. Domingos,¹ T. K. Rubim,¹ R. J. R. Molica,² S. M. F. O. Azevedo,¹ W. W. Carmichael³

¹Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brazil

²Fundação Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco, Recife, CEP 50.420-050, Brazil

³Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, Ohio 45435 USA

Received 6 January 1998; revised 21 February 1998; accepted 30 March 1998

ABSTRACT: Seven strains (NPCA-5, -10, -15, -16, -19, -23, and -29) of picoplanktonic cyanobacteria from Caruaru reservoirs were identified and analyzed for toxicity. We tested the toxicity of these strains by mouse bioassay, by HPLC, and by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Strains NPCA-15 and -23 were toxic when tested by mouse bioassay ($LD_{100} = 600 \text{ mg}_{\text{DW}}/\text{kg}$ body weight). The toxin from strain NPCA-15 had the same UV spectrum as microcystin-LR. All of the strains showed the presence of microcystin by ELISA analysis. The microcystin concentration varied between $0.08 \text{ ng}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (NPCA-5) and $3.7 \text{ ng}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (NPCA-15). Confirmation of microcystin production by picoplankton opens the possibility that these organisms may have contributed to human poisoning in Caruaru and defines a new source of microcystin in water supplies. © 1999 by John Wiley & Sons, Inc. *Environ Toxicol* 14: 31–35, 1999

Keywords: *Aphanocapsa cumulus*; picoplankton; cyanobacterial toxin; blue-green algae; Caruaru, Brazil

INTRODUCTION

Eutrophication in Brazilian water bodies as a consequence of human activities has increased over the last 20 years, especially near urban centers. Anthropogenic inputs by domestic, industrial, agricultural, and urban discharges have been identified as the primary cause for this enrichment.

Phytoplanktonic communities respond to eutrophication with a loss of biodiversity followed by a dominance of cyanobacterial species and the occurrence of water blooms. In Brazil the most common genera in

fresh water supplies and reservoirs as a consequence of eutrophication are *Microcystis*, *Anabaena*, and *Cylindrospermopsis* (Tundisi and Matsumura-Tundisi, 1992). Research carried out at our laboratory at The Federal University of Rio de Janeiro (Costa and Azevedo, 1994) has found cyclic heptapeptide hepatotoxins—the microcystins—in several Brazilian cyanobacterial species that occur in many reservoirs and natural lagoons. Hepatotoxin production was verified in 75% of the tested strains, with the main genus involved being *Microcystis*.

However, the occurrence of toxic nanoplanktonic and picoplanktonic cyanobacterial species has not been well studied (Lincoln and Carmichael, 1981), perhaps

Correspondence to: P. Domingos

© 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

CCC 1520-4081/99/010031-05

due to the higher difficulty of observing and identifying these microorganisms.

During studies carried out to explore the incident of human poisoning involving microcystin that occurred in a dialysis center in Caruaru city (8° 17'S, 35° 58'W) in Pernambuco State, Brazil (Jochimsen et al., 1998), we began testing the toxicity of different cyanobacteria isolated from water supplies in that region. This paper reports the identification of a picoplanktonic cyanobacterial species and microcystin production by laboratory strains of these species.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic Identification and Culture Conditions

Water samples from Engenheiro G. Pontes (Tabocas) and Sr. José Maria reservoirs, which are used as water supplies by the Caruaru population, were collected from March until May 1996 (about 45 days after the death of the first patient). Some subsamples were fixed with Lugol's solution for phytoplankton identification, after other subsamples had been taken to isolate strains for culture. Strains were isolated by spreading 0.1 mL of water sample into Petri dishes containing ASM-1 medium (Gorham et al., 1964) plus 1.0% agar. Single colonies of picoplankton (NPCA-5, -10, -15, -16, -19, -23, and -29) were then cultivated in ASM-1 medium, as nonaxenic batch cultures (1600 mL), at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 12 h and $45 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light intensity was measured with a Li-Cor model LI-185B photon-equipped LI-190SB sensor. Cells growing under these conditions were harvested in the late exponential phase, concentrated by centrifugation, and then lyophilized for toxicity tests and toxin extraction.

The identification of species was made from fixed and live natural samples and cultivated cells by Dr. Jirí Komárek of the University of South Bohemia, Czech Republic.

Cyanobacterial freeze-dried cells were suspended in a 0.9% NaCl solution and tested for toxicity by intraperitoneal (ip) mouse bioassay with ICR Swiss male mice (15–25 g). Mice were observed for 24 h after injection for signs of poisoning indicative of microcystin intoxication.

Toxin Extraction and Detection

Lyophilized cells (approximately 370 mg) for each of the strains (NPCA-5, -10, -15, -16, -19, -23, and -29) were extracted using a modified form of the method of

Krishnamurthy et al. (1986). The cells were extracted three times (1 h) with 1-butanol:MEOH:water (1:4:15, v/v) and cell debris was removed by centrifugation. The supernatants were combined and air-dried to 30% of the original volume. This material was passed through C-18 cartridges (Bond Elut C-18, Varian). The cartridges were washed with water and then eluted in sequence with 20 mL MEOH. The 100% MEOH fraction was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon filter and the MEOH was removed by evaporation. Dried extracts were redissolved in 100% MEOH and the microcystin was separated by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The Shimadzu HPLC system used a Lichrospher 100, C-18 reversed phase column (4 mm \times 12.5 mm, ODS 5 μm), and the separation was carried out under isocratic conditions with a mobile phase of 20 mM ammonium acetate, pH 5.0, and acetonitrile (7:3). The volume injected was 20 μL and the flow rate was 1.0 mL min^{-1} . The toxic peak was detected with UV absorption at 238 nm using a Shimadzu SPD-M 10 A photodiode array detector.

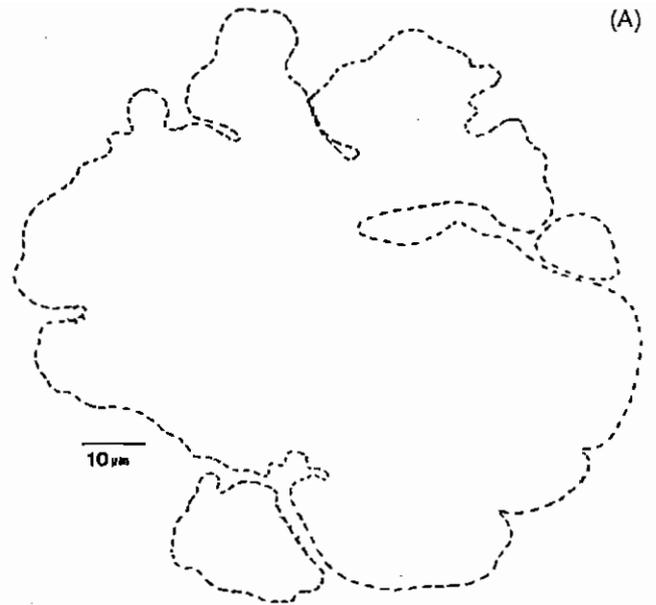
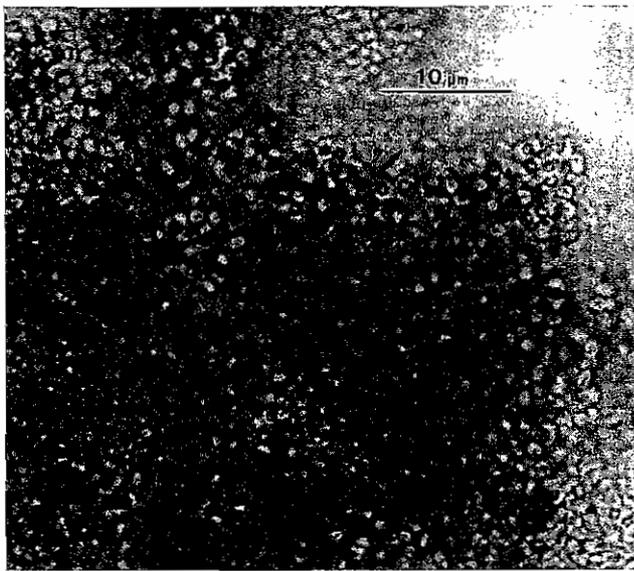
Subsamples of the 100% MEOH fraction were also used in a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that detects microcystins using polyclonal antibodies as described by An and Carmichael (1994).

RESULTS AND DISCUSSION

Strains NPCA-5, -16, -23, and -29 were identified by Dr. Komárek as *Aphanocapsa cumulus*. This picoplanktonic cyanobacterium presents irregular lobate colonies with very densely and irregularly aggregated cells (Fig. 1). Strains NPCA-10, -15, and -19 are solitary picoplanktonic spherical cells, rarely joined into small clusters of several loosely dispersed cells, and enveloped by very fine colorless slime. These strains may represent a stage of development of *A. cumulus* or they are disintegrated colonies of another species. They both have extremely small cells, less than 1 μm in diameter.

Strains NPCA-15 and -23 were toxic when tested by mouse bioassay and had an estimated LD_{100} of 600 mg/kg body weight. Signs of poisoning were similar to those observed with other microcystin-producing cyanobacterial species except that the time of death was more than 6 h after injection. No examination of the livers of the mice was made.

By HPLC analysis, a peak with a similar UV spectrum to microcystin-LR was obtained with the extract



(B)

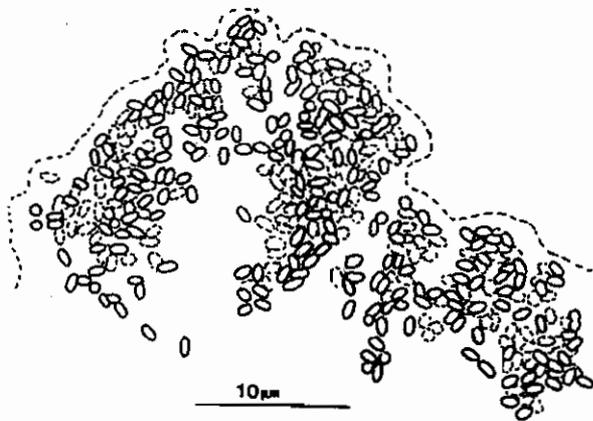


Fig. 1. Picoplanktonic species, *Aphano caps a cumulus*: (A) general view of colony; (B) detail of cells.

of NPCA-15 cells (Fig. 2). The chromatograms of other extracts did not show any peak with this microcystin UV spectrum.

Using ELISA we could detect the presence of microcystin in all strains at low to very low concentrations of between 0.08 (NPCA-5) and 3.7 ng/mg (NPCA-15) (Table I). These microcystin concentrations explain the lack of toxicity observed in the majority of the mouse bioassays and the negative results obtained by HPLC analysis. It is important to emphasize that the toxicity observed for a strain in culture conditions cannot be directly related with the toxicity of this species in the field. Usually a reduction in toxicity occurs when strains are maintained under laboratory conditions; therefore,

the toxin production of these cells could be underestimated. The LD₅₀ for microcystin is about 60 µg/kg (equivalent to 100 µg of toxin per gram of cells DW). However, the ELISA gave only 3.7 µg toxin per gram of cells as the maximum concentration, so it is probable the mouse toxicity was not due to microcystin at all, but to other cell components that are toxic by ip injection.

The toxicity of nano- and picoplanktonic cyanobacteria may represent risk of toxin production in addition to that from known toxic species, especially because this risk is not currently understood. Recently we confirmed microcystin production by a strain of *Synechocystis aqualitis* isolated from a brackish lagoon near the city of Rio de Janeiro (unpublished data). At

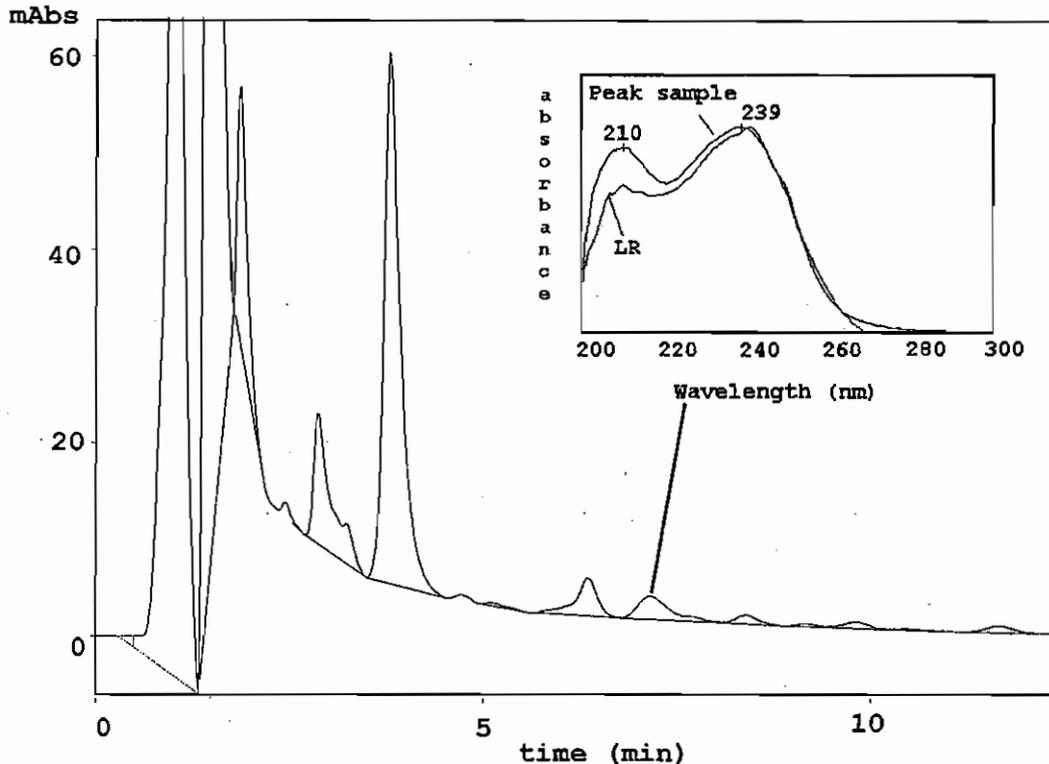


Fig. 2. HPLC chromatogram of an extract of picoplanktonic cells. The inset shows the UV spectrum of the toxin peak and microcystin-LR standard.

present it is not known which cyanobacteria were responsible for the Caruaru tragedy. The confirmation of microcystin production by these species may indicate a possible association between picoplanktonic cyanobacteria and the incident of human deaths in Caruaru.

The production of microcystin by picoplanktonic cyanobacteria shows a new source of microcystin in water supplies and presents a new challenge for public

health and water treatment personnel. Due to the very small size of these cells, their identification requires special care and their removal by traditional methods of water treatment may be more difficult. The potential toxicity of these species needs to be considered and the risks from picoplanktonic cyanobacteria in water samples need to be monitored to control cyanotoxin contamination.

TABLE I. Microcystin concentration of seven strains collected in different water bodies and evaluated by ELISA analysis

Strains	Culture Organisms	Origin of Strain	ELISA (ng/mg)
NPCA-5	<i>Aphanocapsa cumulus</i>	Engenheiro G. Pontes Reservoir (Tabocas)	0.08
NPCA-10	Spherical picoplankton	Sr. José Maria Dam	0.02
NPCA-15	Spherical picoplankton	Sr. José Maria Dam	3.70
NPCA-16	<i>Aphanocapsa cumulus</i>	Sr. José Maria Dam	0.20
NPCA-19	Spherical picoplankton	Sr. José Maria Dam	0.20
NPCA-23	<i>Aphanocapsa cumulus</i>	Sr. José Maria Dam	0.30
NPCA-29	<i>Aphanocapsa cumulus</i>	Eng. G. Pontes Reservoir (Tabocas)	0.10

We thank Dr. Jiri Komarék for helping to identify the cyanobacteria strains. We also thank CNPq/PRONEX for financial support.

REFERENCES

- An, J.; Carmichael, W. W. *Toxicon* 1994, 32, 1495-1507.
- Costa, S. M.; Azevedo, S. M. F. O. *Iheringia* 1994, 45, 69-74.
- Gorham, P. R.; Mclachlav, J. R.; Hammer, V. T.; Kim, W. K. *Verh Int Verein Theor Angew Limnol* 1964, 15, 796-804.
- Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Áholmes, C. E. M.; Antunes, M. B. de C.; Filho, D. A. de Melo.; Lyra, T. M.; Spinelli, V. T.; Azevedo, S. M. F. O.; Jarvis, W. R. *New Eng J Med* 1998, 338, 813-818.
- Krishnamurthy, T.; Carmichael, W. W.; Sarver, E. W. *Toxicon* 1986, 24, 865-873.
- Lincoln, E. P.; Carmichael, W. W. In *The Water Environment: Algal Toxins and Health*; Carmichael, W. W., Ed.; Plenum: New York, 1981; pp. 223-230.
- Tundisi, J. G.; Matsumura-Tundisi, T. In *Algae and Environment: a General Approach*; Cordeiro-Marinho, M.; Azevedo, M. T. P.; Sant'anna, C. L.; Tomita, N. Y.; Plastino, E. M., Eds.; Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo 1992; pp. 1-33.



Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters

V. L. M. Huszar¹, L. H. S. Silva¹, M. Marinho¹, P. Domingos¹ & C. L. Sant'Anna²

¹Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, Rio de Janeiro, 20940-040, Brazil

²Secção de Ficologia, Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, São Paulo, 01061-970, Brazil

Key words: blue-greens (Cyanoprokaryotes), assemblages, productive lakes, Brazil

Abstract

Cyanoprokaryote assemblages of eight very productive Brazilian lakes are described and the main driving forces of their dominance are considered. Relative abundance of blue-greens is shown to have been positively related to temperature, but not to pH or total-P and to have been negatively associated with light, mixing, NO₃, but not with NH₄, total N or total N/total P ratio. Both heterocytic and non-heterocytic groups were negatively related to NO₃. However, if *Cylindrospermopsis* species are considered as non-N₂-fixing organisms (only 10% of the filaments carried heterocytes), the lakes could be considered as dominated by non-N₂-fixing populations during most of the years. In this new scenario, non-N₂-fixing were dominant in NO₃ (but not NH₄) deficient lakes, and in both NO₃ and NH₄ deficient conditions. Assemblages S, S_n, H, M, X₁, as groups of descriptor species of systems having similar features as proposed by Reynolds (1997: Ecology Institute, Oldenburg), were representative of warm, shallow, turbid, enriched and frequently mixed lakes. We propose to move some species from Z (picoplankton of oligotrophic lakes) to X₁ assemblage (nanoplankton of eutrophic lakes) and we comment on *Microcystis* species of M assemblage from mixed shallow lakes in relation to L_m assemblage of end-summer in temperate lakes. S and S_n assemblages, which comprise species which are good-light antennae, were the best represented group in these generally turbid and shallow lakes.

Introduction

There is a growing record of harm caused to public health and to the environment by the development of cyanoprokaryote populations, especially those occurring at high biomass level. The most striking expression has been recorded recently in the northeast of Brazil, with human deaths during hemodialysis, as documented in detail by Jochimsen et al. (1998). Cyanoprokaryotes are frequently associated with eutrophic conditions, but they are also important components of phytoplankton in oligo and mesotrophic waters (Hecky & Kling, 1987; Canfield et al., 1989; Blomqvist et al., 1994; Huszar & Caraco, 1998). Cyanoprokaryote dominance has been associated with several environmental factors such as: low turbulence (Reynolds, 1987, but see Ganf, 1974), low light (Zevenboom & Mur, 1980; Smith 1986), low euphotic

to mixing zone ratio (Jensen et al., 1994), high temperature (Shapiro, 1990), low CO₂/high pH (King, 1970; Shapiro, 1990; Caraco & Miller, 1998), high total-P (McQueen & Lean, 1987; Trimbee & Prepas, 1987; Watson et al., 1997), low total-N (Smith, 1983), low total-N to total P ratio (Smith, 1983), low dissolved inorganic nitrogen (Blomqvist et al., 1994), phosphorus storage strategy (Pettersson et al., 1993), ability to minimize grazing (Haney, 1987) and buoyancy regulation (Reynolds, 1987) as shown in Table 1.

Cyanoprokaryotes, as a major taxonomic division, are able to live in a wide range of environmental conditions, despite their sensitivity to sudden changes in environmental conditions (Paerl, 1988). However, the Blue-Green Algal Paradox described by Paerl persists only if cyanoprokaryotes are considered to be uniform in their requirements (Padisák & Reynolds, 1998). In-

Table 1. Variables in literature expected to be related to relative biomass (%) of taxonomic and heterocytic/non-heterocytic groups. Temp=temperature; Z_{eu} =euphotic; Z_{mix} =mixing zone; Z_{max} =maximum depth. NO_3 , NH_4 , SRP (soluble reactive phosphorus), SRSi (soluble reactive silicon) TN=total nitrogen; TP=total phosphorus

	Physical			pH-System	Dissolved nutrients				Total nutrients		Nutrient ratios
	Temp	Z_{eu}/Z_{mix}	Z_{mix}/Z_{max}	pH	NO_3-NH_4	SRP	SRSi	TN	TP	TN/TP	
Blue-Greens	+(1)	-(2)	-(3)	+(1.4)	-(5)	-(5)	-	-(6)	+(7)	-(6)	
Diatoms	-(8)	-(9)	+(9)	-	-	-	+(10)	-	-	-	
Greens	-	+(11)	-(11)	+(12)	-	-	-	-	+(12)	-	
Heterocytic Blue-greens	+(1)	-(2)	-(3)	+(1.4)	-(5)	-(5)	-	-(6)	+(7)	-(6)	
Non-heterocytic Blue-greens	+(1)	-(2)	-(3)	+(1.4)	-(5)	-	-	-(6)	+(7)	-(6)	

1. Shapiro 1990; 2. Smith 1986; 3. Reynolds 1987; 4. Caraco & Miller, 1998; 5. Blomqvist et al., 1994; 6. Smith 1983; 7. Trimbee & Pepas, 1987; 8. Zhang & Prepas 1996; 9. Sommer 1988; 10. Tilman et al., 1986; 11. Happey-Wood, 1988; 12. Jensen et al., 1994.

deed, the individual species of cyanoprokaryotes are characterized by remarkable specialization.

Different lakes can be characterized by the groups of cyanoprokaryotes and other algae they support, many of which share common advantageous attributes. These groupings can be used to indicate recent environmental conditions, more so than can the phylogenetic representatives (Reynolds, 1997; Huszar & Caraco, 1998). Applying a subdivision based on species strategies (C-invasive, S-acquisitive, R-attuning species), Reynolds (1984, 1988, 1997) separated the pelagic vegetation along phytosociological lines, following the precedent set by terrestrial classifications (Grime, 1979). Cyanoprokaryotes were included in eight of the 27 assemblages proposed by Reynolds (1997), each one of which usually occurs in environments defined by common ranges of trophic state, mixing, latitude, pH, etc. Heterocytic cyanoprokaryotes constitute assemblage H, small-celled colonial chroococcales participate in K, L_m , L_o and M assemblages, filamentous Oscillatoriales, in S and R assemblages, and blue-green picoplankton in Z assemblage. A new assemblage (S_n), close to Oscillatoriales (S), was created for the nitrogen-fixing *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, previously included in H assemblage, based more on its antennal properties (Padisák & Reynolds, 1998).

The investigation reported in this paper was conducted to characterize the cyanoprokaryote assemblages of eight productive tropical Brazilian systems, most of them dominated by blue-greens all over the year, and to propose the main driving forces for that dominance.

Study sites

Most of the water bodies studied are freshwater reservoirs, having, as one of their principal purposes, either urban supply, rural irrigation, fishing, electric power generation or urban landscaping. Such reservoirs are of recent construction (the 1980s), except for Poço da Cruz (1956) and Garças (1928). Only Barra, a coastal oligohaline lagoon, is a natural system. Rain and drought periods regulate, more than seasonal temperature and solar radiation, the dynamic of tropical aquatic systems. Some of the lakes are situated in the tropical region of the Brazilian Southeast (Juturnaíba, Garças and Barra), where the rainfall regime is characterized by more intense precipitation in summer (December–March) and by drought in winter (June–August). Northeastern reservoirs are located in a semi-arid region, two of them in the 'hinterland' ('sertão') (Chapéu and Algodões), where the dry season is harder and longer (May–November) than in the "wilderness" ('agreste') areas (Pão-de-Açúcar and Ingazeiras), the drought period being from August to December. Poço da Cruz is located between the 'hinterland' and the 'wilderness', with an intermediate rainfall regime. Limnological information about these lakes is given in Table 2.

Juturnaíba Reservoir, originally a freshwater coastal lagoon, and Barra lie on the quaternary plain of Rio de Janeiro State and their drainage basins are occupied mainly by cultivated lands and/or urban areas. Frequent fish-mortalities have been recorded in Barra lagoon during the summer. Garças is located on Pre-Cambrian gneiss rocks and continuously receives sewage from the City of São Paulo Zoological Park. Chapéu, Algodões, Pão-de-Açúcar, Ingazeiras and Poço da Cruz lie on limestone rocks, in Pern-

Table 2. Main features of studied water bodies (physical and chemical variables averages during the annual cycle). Abbreviations as in Table 1.

	Juturnaíba	Garças	Barra	Chapéu	Algodões	Poço da Cruz	Pão de Açúcar	Ingazeiras
Main Uses	Water Supply	Landscaping	Natural	Irrigation	Water Supply	Irrigation	Irrigation	Water Supply
Coordinates	22° 33' S,	23° 39' S,	22° 55' S,	08° 05' S,	07° 53' S,	08° 30' S,	08° 22' S,	08° 03' S,
	42° 18' W	46° 37' W	42° 47' W	39° 34' W	40° 05' W	37° 44' W	36° 42' W	36° 58' W
Area (km ²)	43.0	0.09	6.2	26.0	11.6	56.0	5.0	1.3
Volume (10 ³ m ³)	100 000	402	—	188 000	58 400	504 000	55 000	4600
Watershed Area (km ²)	2113	—	350	2826	2140	5000	438	842
Annual Precipitation (mm)	2431	1400	1300	604	487	627	763	588
Air Temperature (°C)	24	19	23	—	—	—	—	—
Water Temperature (°C)	25.7	22.5	27.7	27.8	27.0	26.6	25.2	27
Secchi (m)	0.5	0.4	0.4	—	—	—	—	—
Z _{eu} (m)	1.4	1.1	0.9	0.9	1.2	1.7	1.7	1.3
Z _{mix} (m)	5.0	3.6	1.0	3.4	4.3	12	8.7	5.6
Z _{max} (m)	5.0	4.5	1.0	3.9	4.3	12	8.7	5.6
Z _{eu} /Z _{mix}	0.3	0.3	0.9	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2
Z _{mix} /Z _{max}	1	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
pH	7.2	8.1	9.0	8.7	8.3	8.1	8.6	8.7
Alkalinity (μEq l ⁻¹)	—	958	—	3641	3327	2641	3277	2892
NO ₃ ⁻ (μM)	3.9	3.5	1.1	1.9	1.3	3.8	5.6	1.6
NH ₄ ⁺ (μM)	1.6	39.0	7.6	2.5	2.3	2.3	6.1	3.6
DIN (μM)	5.5	42.5	8.7	4.4	3.6	6.1	11.7	5.2
SRP (μM)	0.87	0.03	2.50	1.50	0.94	0.77	0.37	2.45
SRSi (μM)	29.6	0.3	—	—	—	—	—	—
TN (μM)	14	59	132	299	246	83	190	203
TP (μM)	3.5	1.6	11.9	14.9	22.1	4.9	5.2	7.7
TN/TP	5	51	12	19	33	22	45	51
Chlorophyll (μg l ⁻¹)	60	59	105	229	64	15	97	87
Biomass (mg l ⁻¹)	17	50	29	58	75	2	35	45

ambuco State and their drainage basins are subject to incipient agriculture and livestock raising.

Materials and methods

Samples were taken weekly, biweekly, monthly or irregularly (1–3 monthly intervals), during 1 year, respectively, in Barra, Juturnaíba, Garças and the reservoirs in the Northeast. Limnological samples were taken from the surface at a fixed point in most of the lakes in the deepest part of the lakes in most cases. Except for temperature, which measured as a profile, all samples were taken from a depth of 0.2 m beneath the surface. The variables analyzed were temperature, transparency, pH, alkalinity, total phosphorus and nitrogen (TP, TN), phosphorus as soluble reactive phosphorus (SRP), silicon as soluble reactive

silicon (SRSi), nitrogen as nitrate (NO₃), nitrogen as ammonium (NH₄) and chlorophyll *a*. Methodology is detailed in Carmouze et al. (1994) and Domingos et al. (1994) for Barra; Paranhos (1996) for Juturnaíba; Carmouze (1994) for Northeast reservoirs; and Sant'Anna et al. (1997) for Garças. Phytoplankton samples were fixed with Lugol's solution and populations were enumerated in random fields, using the inverted microscope method (Utermöhl, 1958). It was not possible to enumerate *Cylindrospermopsis catemaco* and *C. philippinensis* separately, because they were distinguished as separate species only after counting. Specific biomass was estimated from the product of the population and mean unit volume (Edler, 1979), assuming a specific density of phytoplankton cells of 1 g cm⁻³. In general, average cell size was based on at least 20 measurements.

Mixing zone (Z_{mix}) was identified from the temperature profiles. Euphotic zone (Z_{eu}) for Garças, Juturnaíba and Barra was calculated as 2.7 times the Secchi disk depth (Cole, 1994) or has measured in the Northeast reservoirs, using Li-Cor sub aquatic photometer. Ratio of Z_{eu} to Z_{mix} was used as an index light availability in the mixing zone (Jensen et al., 1994). Relative abundance of taxonomic groups was considered following the system of van den Hoek et al. (1997); separating Cyanophyta (cyanoprokaryotes), Cryptophyta, Dinophyta (dinoflagellates), Bacillariophyta (diatoms), Chrysophyta, Xanthophyta, Euglenophyta and Chlorophyta (greens). Cyanoprokaryotes were also separated into heterocytic and non-heterocytic organisms. Relationships between phytoplankton groups and environmental variables were assessed by Spearman Rank Correlation. Only significant correlations ($p < 0.05$) were considered. Assemblages were labeled according to Reynolds (1997) and Padisák & Reynolds (1998).

Results

Lake chemical and physical regimes

Light, temperature and mixing regimes varied little among the systems studied. Considering the Z_{eu}/Z_{mix} ratio as a light-level indicator in surface waters, most lakes can be considered turbid (Table 2). The highest and lowest ratios noted have been recorded, respectively, in the coastal lagoon (0.9) and in one of the Northeast reservoirs (Poço da Cruz: 0.1), the latter has a high suspended inorganic content. Light in the mixing zone has varied little in each lake, large fluctuations (≥ 2 -fold) having been recorded only once, in Garças at the end of spring and early summer. As expected, the average temperature of surface waters was high (Table 2). Only Garças stratified persistently (for a few weeks) during spring and summer (warm polymictic discontinuous). All others circulate at a time at least once at each day, mainly during the night period (warm polymictic continuous).

Compared to the physical factors considered, chemical features showed higher variability. The highest average alkalinity values occurred in reservoirs from semi-arid region (Table 2), with remarkable temporal fluctuations in all lakes. Most of these are alkaline systems, with pH values above 8.0 (Table 2). Circumneutral waters (pH 7.2) was encountered only in Juturnaíba. The two Southeastern reservoirs

(Juturnaíba and Garças) showed the greatest temporal variations in pH.

In general, total nutrient (N and P) concentrations were high in most of the lakes (Table 2), with intralake variations during the study. However, TP (Garças) and TN (Juturnaíba) concentrations were, on average, lower than in the others. On average, SRP has been relatively high in most lakes (Table 2). Only Garças showed low average concentrations ($0.03 \mu\text{M}$), without considerable temporal fluctuations. Variability was remarkable, however, especially in the coastal lagoon following fish-mortality, when SRP concentrations were approximately six-fold higher. Almost eight-fold variations were observed in the Northeastern reservoirs.

Except for Garças, which receives sewage from a zoological garden and, in lower extension, Barra and Pão de Açúcar, the systems have relatively low average concentrations of dissolved inorganic nitrogen (DIN) (Table 3). In four of these, ammonium made the larger contribution, which may be on average twice (Algodões, Ingazeiras) up to 11 times (Garças) greater than that of the NO_3 contribution. The opposite is true in Juturnaíba and Poço da Cruz, where NO_3 is approximately twice as high as NH_4 . The other reservoirs had similar average concentrations of both nutrients (Chapéu and Pão-de-Açúcar).

Phytoplankton seasonal cycles

Approximately 285 species were recorded for the eight lakes; 49 of these were cyanoprokaryotes. Only 11 cyanoprokaryote species achieved dominance (Table 3). Among the taxonomic classes, representative of the Chlorophyceae and Bacillariophyceae acquired a certain importance in biomass, at least once during the annual cycle.

Average total phytoplankton biomass (Table 2), for each lake varied between 2 mg l^{-1} (Poço da Cruz) and 75 mg l^{-1} (Algodões). Two general seasonal phytoplankton biomass patterns have been recognized (Figure 1). The first, a trimodal seasonal cycle, was detected in Barra lagoon and Garças reservoir. In Barra, the peaks were dominated by non-heterocytic cyanoprokaryotes (*Jaaginema subtilissimum* [Kützing] Anagnostidis & Komárek) in mid-spring, and by non-heterocytic *Synechocystis aquatilis* Sauvageauf. *salina* [Wislouch] Komárek in mid-summer. The third maximum occurred at the end of summer, followed by fish-mortality and was dominated by greens (*Chlorella vul-*

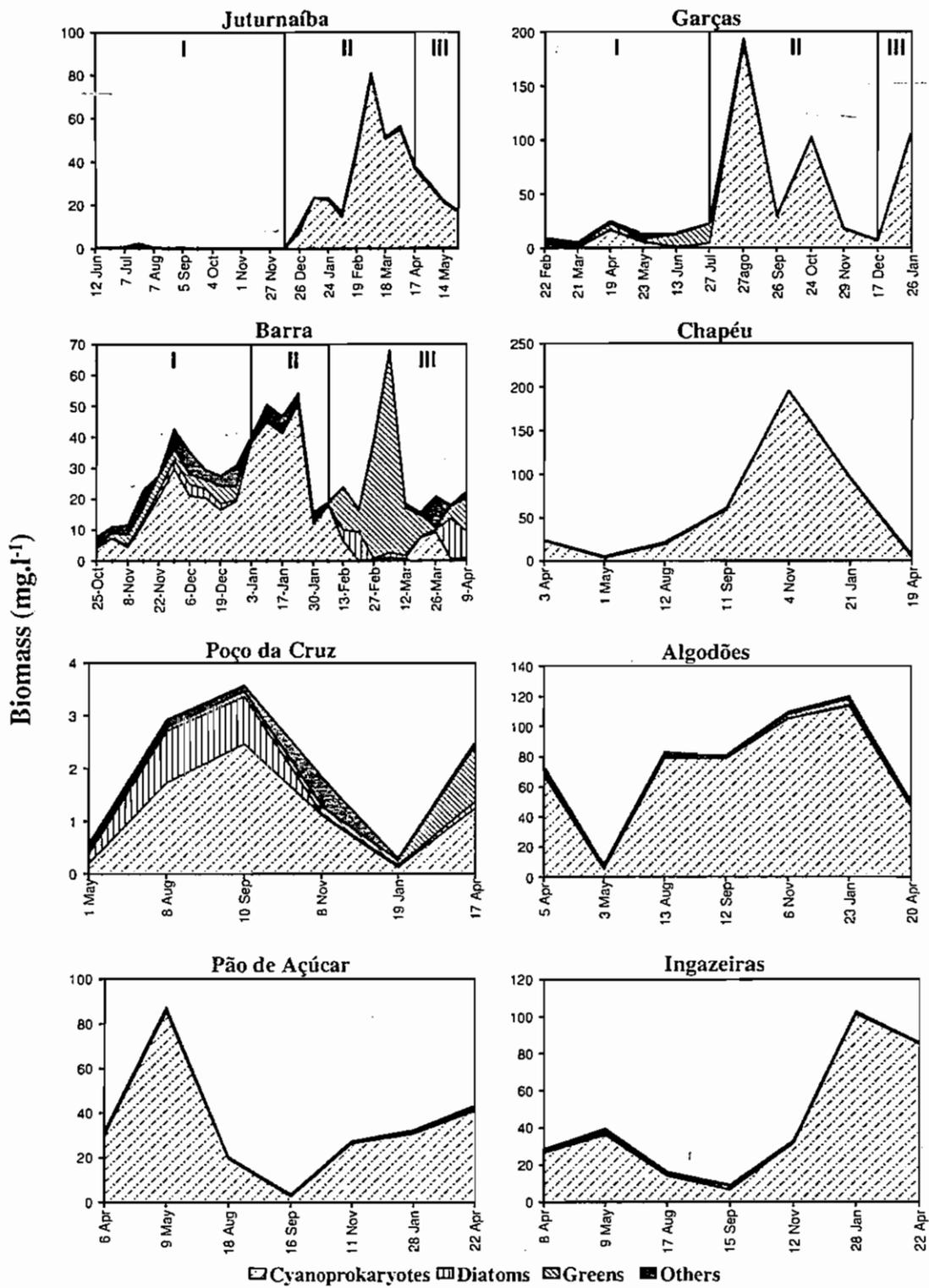


Figure 1. Figure 1 Biomass ($\text{mg} [\text{wet weight}] \text{l}^{-1}$) of taxonomic groups during an annual cycle in the eight study lakes. I, II and III are periods described by different phytoplankton assemblages.

Table 3. Percentages of phytoplankton assemblages (Ass.) as dominant groups of species, by period in each lake. Labels according to Reynolds (1997), Padisák & Reynolds (1998) and modifications in this paper

	Period I	Ass.	Period II	Ass.	Period III	Ass.
Juturnaíba	12 Jun–10 Dec		26 Dec–17 Apr		30 Apr–14 May	
	22% <i>Aulacoseira distans</i>	D	72% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M	46% <i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	S _n
	21% <i>Cryptomonas</i> sp. 11% Dinoflagellate	Y L	11% <i>Anabaena spiroides</i>	H	42% <i>Anabaena spiroides</i>	H
Garças	22 Feb–27 Jul		27 Aug–17-Dec		26 Jan	
	15% <i>Microcystis aeruginosa</i>	M	68% <i>M. lamelliformis</i> , 11% <i>M. aeruginosa</i>	M	81% <i>Geitlerinema</i> sp	S
	10% <i>Peridinium volzii</i> 12% <i>Cryptomonas</i> sp.	L Y				
Barra	25 Oct–3 Jan		10 Jan–6 Feb		13 Feb–9 Apr	
	37% <i>Jaaginema subtilissimum</i>	S	76% <i>Synchoecystis aquatilis</i>	X ₁	21% <i>C. vulgaris</i> var. <i>autotrophica</i>	X ₁
	14% <i>Anabaenopsis elenkinii</i>	H	8% <i>Anabaenopsis elenkinii</i>	H	15% <i>Oocystis submarina</i> 9% <i>Chlorella minutissima</i>	
Chapéu	4 Apr 95–19 Apr 96					
	33% <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 25% <i>C. philippinensis/C. catemaco</i> 15% <i>Phormidium</i> sp	S _n S				
Algodões	5 Apr 95–20 Apr 96					
	84% <i>C. philippinensis/C. catemaco</i>	S _n				
Poço da Cruz	5 Apr 95–17 Apr					
	42% <i>C. raciborskii</i> 14% <i>Aulacoseira granulata</i> 10% <i>Cryptomonas cf. marsonii</i>	S _n P Y				
Pão de açúcar	6 Apr 95–27 Apr 96					
	78% <i>C. raciborskii</i>	S _n				
Ingazeiras	8 Apr 95–22 Apr 96					
	70% <i>C. philippinensis/C. catemaco</i> 13% <i>C. raciborskii</i>	S _n				

garis Bejerinckvar. *autotrophica* [Shibira & Krauss] Fott & Nováková and *Oocystis submarina* Lagerheim). All peaks at Barra lagoon were recorded in rainy and high temperature periods.

Microcystis cf. lamelliformis Holsinger was dominant during the winter and spring peaks in Garças reservoir. The third peak was reported during mid-summer, to be dominated by *Geitlerinema* sp.

The second seasonal pattern comprised unimodal cycles with a single biomass maximum prevailing for long periods (4–9 months), as in Juturnaíba and Northeast reservoirs. Maximum biomass in Juturnaíba occurred between early summer and fall, with a dominance of *Microcystis aeruginosa* Kützing

during the summer and *Cylindrospermopsis philippinensis* (Taylor) Komárek and *Anabaena spiroides* Klebahn during the fall. In the Northeast region, seasonality is set most by the distribution of rains throughout the year. Phytoplankton maxima can occur 1. during drought (Poço da Cruz), or during rains (Pão-de-Açúcar); 2. from the end of drought to the beginning of rains (Chapéu and Ingazeiras) or 3. from the intermediate season until rainy season (Ingazeiras), or even, 4. during more than half-year encompassing dry and rainy season weather (Algodões). All peaks in the Northeast reservoirs were dominated by heterocytic cyanoprokaryotes: *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolozynska) Seenayya *et*

Table 4. Correlation coefficients (r) between total biomass mg l^{-1} , % of biomass of taxonomic divisions, heterocytic and non-heterocytic cyanoprokaryotes, and some abiotic variables for the combined data set of the eight lakes. Only those significant ($p < 0.05$) are shown. Abbreviations as for Table 1, ($n=26$, Juturnaíba and Barra; $n=12$, Garças; $n=7$, Chapéu, Algodões, Poço da Cruz, Pão de Açúcar, Ingazeiras. (*) Represents agreement with literature expectations

	Physical			pH-system pH	Dissolved nutrients				Total nutrients		Nutrient ratio TN/TP
	Temp	Z_{eu}/Z_{mix}	Z_{mix}/Z_{max}		NO_3	NH_4	SRP	SRSi	TN	TP	
Total Biomass	0.27	—	—	0.49	-0.43	—	—	—	0.66	—	0.28
Cyanoprokaryotes	0.20*	-0.20*	-0.21*	—	-0.44*	—	-0.32	—	0.33	—	0.37
Diatoms	—	—	0.35*	0.20	0.27	—	0.43	0.34*	-0.29	0.33	-0.52
Greens	—	0.27*	0.37	—	0.27	—	0.36	—	—	0.39*	-0.33
Heterocytic cyanoprokaryotes	0.24*	-0.24*	0.33	0.25*	-0.28*	—	—	0.47	0.66	0.24*	—
Non-heterocytic cyanoprokaryotes	0.25*	0.37	-0.29*	0.35*	-0.20*	—	—	—	—	0.25*	-0.37*

Subba Raju in Pão de Açúcar and Poço da Cruz, *C. philippinensis/C. catemaco* Komárková-Legnerová & Tavera in Ingazeiras and Algodões, and codominance of *C. raciborskii* and *C. philippinensis/C. catemaco* in Chapéu. In addition, a few other species contributed to the total phytoplankton biomass of the lakes studied, mainly representatives of greens and diatoms (Table 3).

The two groups comprising the cyanoprokaryote biomass – heterocytic and non-heterocytic – are herein assumed to be functionally distinct – N_2 -fixing and non- N_2 -fixing – and whose abundance is examined relative to total phytoplankton biomass. By pooling the entire data set, the seasonal cycle in total biomass and in relative abundance of both taxonomic and heterocytic/non-heterocytic groups were not, in general, well explained by physical and chemical variations (Table 4). Total biomass was positively associated with temperature, pH, TN and TN/TP ratio and negatively with NO_3 . In spite of the low agreement with the expectations, some major taxonomic groups were related to a small number of expected variables (Table 4). Cyanoprokaryotes were negatively associated with light in the mixing zone, mixing and NO_3 . There were also unexpected inverse relationships between cyanoprokaryotes and SRP, and direct with TN and TN/TP ratio. The expected direct relationships with pH, TP and inverse with TN and TN/TP ratio were not found.

Other relatively well-represented taxonomic groups were related to a few number of expected variables. Diatoms were directly associated with mixing and SRSi, and greens with light in the mixing zone and TP. These groups were also related to some unexpected variables. Greens were positively related to Z_{mix}/Z_{max} , NO_3 , SRP and negatively to TN/TP ratio; diatoms

were positively associated with pH, NO_3 , SRP and TP, and negatively with TN and TN/TP ratio.

Both heterocytic and non-heterocytic cyanoprokaryotes are thought to be associated with the same variables for the entire taxonomic group. In addition, DIN (NO_3 and NH_4) and TP have been mentioned in the literature as having some influence on the distribution of these groups (Table 1). As expected, heterocytic blue-greens were directly related to temperature, pH and TP, and negatively to Z_{eu}/Z_{mix} ratio and NO_3 . They were also directly associated with some unexpected variables (mixing, SRSi, TN). Non-heterocytic cyanoprokaryotes were related positively to temperature, pH and TP, and negatively to mixing, NO_3 and TN/TP ratio. Positive relationship between non-heterocytic blue-greens and light in the mixing zone was not expected.

Discussion

Although the number of instances of hypertrophy in freshwater ecosystems is steadily increasing, there are still rather few studies on the structure and function of phytoplankton in affected lakes, both in tropical and temperate regions (Alvarez-Cobelas & Jacobsen, 1992). Hypertrophic temperate lakes are, in general, dominated by blue-greens during the summer (Watson et al., 1997) but also by greens as in hypertrophic shallow temperate lakes (Alvarez-Cobelas & Jacobsen, 1992, Jensen et al., 1994). Considering maxima and annual means of chlorophyll and annual mean TP concentrations (OECD, 1982; Nürnberg, 1996), most of our lakes are placed at the hypertrophic end of the trophic spectrum. However, in terms of the chlorophyll supported, Poço da Cruz meets the criterion of a eu-

trophic reservoir, but it is hypertrophic on the basis of its TP concentrations. The converse is true for Garças. The difficulties of applying to tropical areas criteria for trophic status, developed for temperate regions, have already been pointed out by Huszar et al. (1998).

Blue-green dominance depends substantially on a degree of environmental constancy (Paerl, 1988; Padisák & Reynolds, 1998). Less sharp seasonality in the tropics may lead to a higher probability for existence of long-lasting blue-green stages as observed in the studied lakes. Indeed, cyanoprokaryotes were dominant during 100% of the annual cycle in North-east reservoirs and between 60 and 70% of the year in Southeast lakes.

Considering the data as a whole, variations in representation of taxonomic groups were not well predicted from physical or chemical variables. As expected, diatoms were positively associated with mixing (Sommer, 1988) and silicon (Tilman et al., 1986), and greens only with light in the mixing zone (Happey-Wood, 1988). The relative abundance of cyanoprokaryotes was inversely related to light, turbulence, NO_3 , and directly to temperature, but not directly to pH, TP and inversely to TN and TN/TP ratio, as claimed in the literature. Most of those fall within a narrow range of values in the lakes considered. Maybe this is one of the causes for the poverty of relationships found between relative abundance of cyanoprokaryotes and some of the expected variables. However, the relative abundance of this group was associated with some unexpected factors, such as low SRP.

Relative abundance of cyanoprokaryotes has often been claimed to be directly dependent upon TP concentrations (Trimbee & Prepas, 1987; Watson et al., 1997) and inversely so to TN/TP ratio (Smith, 1983). However, high TP ($>32 \mu\text{M}$) has also been associated with greens in shallow hypertrophic temperate systems (Jensen et al., 1994), as a function of the continuous input of nutrient and carbon from sediments and external sources, selecting fast-growing chlorophytes. TP variations in our lakes were not in that range showed by Jensen et al. (1994), but they were in the typical range mentioned for blue greens ($<26 \mu\text{M}$). In spite of cyanoprokaryotes being dominant in certain systems with low TP concentrations (Hecky & Kling, 1987; Canfield et al., 1989; Huszar & Caraco, 1998), in our lakes they have been dominant in TP levels more frequently reported in literature. Similarly, the TN/TP ratio in our lakes was also included in those levels (<29 , by weight; 64, by atom), in which blue-greens commonly are dominant (Smith, 1983). So, it

is understandable not to find the expected relationships between relative abundance of cyanoprokaryotes and TN/TP ratio or TP concentrations. Functional groups of cyanoprokaryotes have also been associated with TP levels. Heterocytic forms are thought to be dominant in concentrations $<8 \mu\text{M}$ and non-heterocytic between 8 and $26 \mu\text{M}$ (Jensen et al., 1994). Considering the established periods, we found that both groups of cyanoprokaryotes can dominate, independently of the TP levels.

Dominance of nitrogen fixers has been supposed to be favored, among other factors, by their ability to function in N-deficient systems; dominance of non- N_2 -fixing cyanoprokaryotes may be explained by an ability to outcompete most other phytoplankton groups for NH_4 in NO_3 depleted waters (Blomqvist et al., 1994). Four patterns can be identified by comparing periods of blue-green dominance, using an approximation about N-limitation (DIN concentrations $<8 \mu\text{M}$, Reynolds, 1997, and uptake half-saturation constant for NO_3 [$3.7 \mu\text{M}$] and NH_4 [$2.2 \mu\text{M}$], Huszar & Caraco, 1998): (a) chronically DIN-deficient lakes, with non-heterocytic (Juturnaíba, Period II; Barra, Periods I and II) or heterocytic dominance (Juturnaíba, Period III); (b) chronically NO_3 but not NH_4 -deficient lake, with non-heterocytic dominance (Garças); (c) chronically NO_3 but not NH_4 -deficient reservoirs, with heterocytic dominance (Chapéu, Poço da Cruz, Algodões and Ingazeiras; and (d) non N-deficient lake with heterocytic dominance (Pão de Açúcar). The expected relationships between DIN forms and functional groups of cyanoprokaryotes (Blomqvist et al., 1994) were not clear in our lakes. Despite of both functional groups of cyanoprokaryotes being significantly related to low NO_3 , heterocytic, instead non-heterocytic, occurred in non N-deficient lakes, at least by NH_4 .

Cylindrospermopsis, a heterocytic genus, was the most important in our lakes (*C. raciborskii*, *C. catemaco*, *C. philippinensis*). However, only 10% of the filaments of the three species possessed heterocytes in Northeast reservoirs. This fact has been also reported for Paranoá reservoir (Brazil) for *C. raciborskii* (Branco & Senna, 1994). *C. raciborskii* has been reported as a species with high affinity for ammonium, using this nutrient in such concentrations in which the other heterocytic species already need to fix N (Présing et al., 1996; Padisák, 1997). Most of *Cylindrospermopsis* populations were dominant in non-N-deficient conditions at least with respect to NH_4 (patterns c and d), so enhancing the similarity

of these versatile species to non-heterocytic filamentous blue-greens (Oscillatoriales). If we consider these organisms to be non-N₂-fixing species, the patterns observed in most of the lakes, would be more understandable, according to Blomqvist et al. (1994) considerations, because non-N₂-fixing were dominant in NO₃ but not NH₄ deficient reservoirs (Chapéu, Algodões, Poço da Cruz, Ingazeiras) and in a non-N-deficient lake (Pão de Açúcar). However, we still observed periods of dominance of non-heterocytic species in chronically DIN-deficient lakes (*M. aeruginosa* in Juturnaíba, *J. subtilissimum* and *S. aquatilis* in Barra).

Groups of species have sometimes been thought of as system descriptors; their similar features, would us to understand, for a certain degree of prediction from these features, why recurrent groups of correspondent species can be identified (Reynolds, 1997). So, it is important to the development of a comprehensible scheme of community assemblage and phytoplankton selection, to determine which environmental conditions make possible consistent predictions. We were able to ascribe our data on the algal cycles to nine assemblages. Four of these were made up of cyanoprokaryotes, one of greens, two of diatoms, one of dinoflagellate and one of cryptophytes. The environmental constancy in Northeast reservoirs allowed us to identify one dominant assemblage over a calendar year, which included the same species. Each Southeast lakes showed three periods described by different assemblages (Table 4).

S and S_n assemblages of functional non-N₂-fixing and good light antennae group characterize mixed, turbid, shallow and enriched lakes (Reynolds, 1997; Padisák & Reynolds, 1998). In our lakes, these assemblages embrace *Cylindrospermopsis* species, *Jaa-ginema*, *Phormidium* and *Geitlerinema* (the last three formerly as *Oscillatoria*). They were dominant during the entire annual cycle in the Northeast reservoirs or, at least in one of the survey periods, in Barra and Juturnaíba. Padisák & Reynolds (1998) proposed S_n assemblage based upon the physiological attributes of *Cylindrospermopsis*, including its low light requirements, rather than its N₂ fixing capacity. These features place *Cylindrospermopsis* – previously included in H assemblage of Nostocales (Reynolds, 1997) – ecologically closer to the Oscillatoriales. As mentioned, only 10% of *Cylindrospermopsis* filaments from Northeast reservoirs carried heterocytes, when they are arguably unnecessary in those rarely N-deficient lakes, as also commented by Padisák &

Reynolds (1998). However, in Juturnaíba reservoir (Period 3), during a strong N-limitation (not detected NO₃), codominance of *Cylindrospermopsis phillip-pinensis* and *Anabaena spiroides* was showed. In that period, 30% of *Cylindrospermopsis* filaments carried heterocytes, indicating that at least part of the population was fixing nitrogen. The presence of heterocytes in this genus has been noted during low-DIN phases in Kariba reservoir (Ramberg, 1987) and in Lake Valencia (Lewis & Riehl, 1982). Then, it is reasonable to regard *Cylindrospermopsis* as a genus with alternative physiological adaptations between S and H assemblages.

Warm waters, good nutrient supplies but with low DIN may support the heterocytic blue-green H assemblage (Reynolds, 1997). Only two representatives of this assemblage was recorded in our lakes: *Anabaena spiroides* as codominant with S_n assemblages during a N-deficient period, in absence of NO₃, in Juturnaíba reservoir, and *Anabaenopsis elenkini* Miller f. *hungarica* (Halász) Jeeji-Bai, Hegewald et Soeder, as subdominant with S or X₁ assemblages in Barra lagoon.

M assemblage, formed by *Microcystis* species, may dominate in shallow lakes with daily mixing in low latitudes (Ganf, 1974; Reynolds, 1997). *M. aeruginosa*, for example, can accommodate to intense diel changes in vertical mixing better than non- or weakly-motile algae. This self-regulating specialized species is thought be dominant in turbid and frequently well-mixed lakes, only if the income of radiation is not prejudicial to the extent of growth. However, the morphological properties of both small (<200 μm) and big (200–421 μm) colonies of *M. aeruginosa* from Juturnaíba reservoir (surface/volume, S/V, ratio: 0.6–1.2 μm⁻¹ and maximum linear dimension, MLD, times S/V: 239–261) are placed on the transition between S and R-strategists, and not as the very clear S-strategist shown in Reynolds' (1997) diagram. *Microcystis* from our lakes, mainly colonies greater than 100 μm diameter were flattened, increasing the S/V ratio over the equivalent spherical shape assumed in Reynolds' (1997) calculations, and consequently better light antennae than round ones.

Z assemblage was proposed for picoplankton organisms, among them *Synechocystis aquatilis* and *Chlorella minutissima*, as representative of surface waters of large, clear and oligotrophic lakes (Reynolds, 1997). These small nanoplankton species (3.0–4.0 μm, Menezes & Domingos, 1994), with high growth rates (Nascimento & Azevedo, 1998; Huszar

et al., 1998) were common in Barra, a system with enriched and relatively clear waters, as are usual in other shallow hypertrophic coastal lagoons of Rio de Janeiro State (Domingos & Carmouze, 1993). These features, allied to high tropical temperatures, impose a very fast dynamic (Machado, 1989), selecting for invasive species in conditions of accessibility of resources. Considering that the scheme of Reynolds (1997) is still under development and considering the morphological/functional attributes of both mentioned organisms, we propose their inclusion in X_1 assemblage, integrating the eutrophic, non-motile nanoplankton grouping.

Most of the lakes studied were marked by the occurrence of assemblages comprised of species from other taxonomic divisions, although with much inferior biomass contributions. Eventually, the following assemblages were recognized: **Y** assemblage, formed by ubiquitous cryptophytes common in moderately enriched systems; **P** assemblage, comprising filamentous diatoms, is common in large mesotrophic lakes in low latitudes; **L** assemblage, which includes large dinoflagellates usually found in mesotrophic to eutrophic waters; and **D** assemblage comprising small centric diatoms of shallow, hypertrophic ponds. We include *Aulacoseira distans* (Ehrenberg) Simonsen in **D** assemblage, accepting Reynolds' (1997) and Olrik' (1994) considerations for small centric diatoms.

In synthesis, our data support the view that the delimitation of both the blue-green and non-blue-greens assemblages applies reasonably closely to the assemblages found in tropical enriched systems, despite having been formulated originally to describe algae encountered in higher latitude systems (Reynolds, 1984, 1997). Most of them are also representative of warm, shallow, turbid and frequently mixed environments, which selected grouping of species according to their morphological/functional pre-adaptations. The strategies of species which make up **M**-assemblage, however, is not clear. In our view, *Microcystis aeruginosa* and *M. cf. lamelliformis*, with their flattened colonies, may work closer to **R**-strategist group in our tropical, shallow, turbid lakes, than the spherical *Microcystis* of **L_m** assemblage, from temperate, stratified lakes. Assemblage X_1 , which is representative of **C**-strategist grouping, is selected by conditions of both high nutrient and light in the coastal lagoon, a relatively clear lake, with accessible resources. And finally the most representative assemblages in our waters. **S** and **Sn**, are representatives of **R**-strategists, which are thought to be adapted to conditions of low light. be-

cause they are good light antennae (Reynolds, 1988, 1997).

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Judith Padisák for helpful comments on the manuscript. This research was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação José Bonifácio-UFRJ, Brazil and ORSTOM, France.

References

- Alvarez-Cobelas, M. & B. A. Jacobsen. 1992. Hypertrophic phytoplankton: an overview. *Freshwat. Biol.* 2: 184-199.
- Blomqvist, P., A. Pettersson & P. Hyenstrand. 1994. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems. *Arch. Hydrobiol.* 132: 141-164.
- Branco, C. W. C. & P. A. C. Senna. 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algal. Stud.* 75: 85-96.
- Canfield, D. E. Jr, E. Philips & C. M. Duarte. 1989. Factors influencing the abundance of blue-green algae in Florida lakes. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 46: 1232-1237.
- Caraco, N & R. Miller. 1998. Direct and indirect effects of CO₂ on competition between a cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 55: 54-62.
- Carmouze, J. P., C. E. Sampaio & P. Domingos. 1994. Évolution des stocks de matière organique et de nutriments dans une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 217-234.
- Carmouze, J. P. 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Editora Edgard Blücher/FAPESP. São Paulo: 253 pp.
- Cole, G. A.. 1994. Textbook of Limnology. Waveland Press Inc. Illinois: 491 pp.
- Domingos, P. & J. P. Carmouze. 1993. Influences des intrusions de masses d'air polaires sur le phytoplancton et le métabolisme d'une lagune tropicale. *Rev. Hydrobiol. trop.* 26: 257-267.
- Domingos, P., V. L. M. Huszar & J. P. Carmouze. 1994. Composition et biomasse du phytoplancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. *Rev. Hydrobiol. trop.* 27: 235-250.
- Edler, L. (ed.). 1979. Recommendations for Marine Biological Studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. (UNESCO. Working Group 11, Baltic Marine Biologists): 38 pp.
- Grime, J. P., 1979. Plant Strategies and Vegetation Processes. John Wiley & Sons, Chichester.
- Ganf, G. G., 1974. Diurnal mixing and the vertical distribution of phytoplankton in a shallow equatorial lake (Lake George) Uganda. *J. Ecol.* 62: 611-629.
- Haney, J. F., 1987. Field studies on zooplankton-Cyanobacteria interactions. *New Zealand J. mar. Freshwat. Res.* 21: 467-475.

- Happey-Wood, C. M., 1988. Ecology of freshwater planktonic green algae. In Sandgren, C. D. (ed.), *Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 175-226.
- Hecky R. & H. J. Kling, 1987. Phytoplankton ecology of the great lakes in the rift valleys of central Africa. *Arch. Hydrobiol.* 25: 197-228.
- Huszar, V. L. M. & N. Caraco, 1998. The relationship between phytoplankton composition and physical-chemical variables: a comparison of taxonomic and morphological-functional approaches in six temperate lakes. *Freshwat. Biol.* 40: 1-18.
- Huszar, V. L. M., L. H. S. Silva, P. Domingos, M. M. Marinho & S. Melo, 1998. Phytoplankton species composition is more sensitive than OECD criteria to the trophic status of three Brazilian tropical lakes. *Hydrobiologia* 369/370 (Dev. Hydrobiol. 129): 59-71.
- Jensen, P., E. Jeppesen, K. Orlík & P. Kristensen, 1994. Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 51: 1692-1699.
- Jochimsen, E. M., W. W. Carmichael, J. S. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. E. M. Holmes, M. B. C. Antunes, D. A. Melo-Filho, T. M. Lyra, V. S. T. Barreto, S. M. F. O. Azevedo & W. R. Jarvis, 1998. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 338: 873-88.
- King, D. L., 1970. The role of carbon in eutrophication. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.* 42: 2035-2051.
- Lewis Jr., W. M. & W. Riehl, 1982. Phytoplankton composition and morphology in Lake Valencia, Venezuela. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 67: 297-322.
- Machado, E. C., 1989. Desoxigenação e regeneração de nutrientes na lagoa de Guarapina, Rio de Janeiro. UFF, Niterói. (Dissertation)
- McQueen, D. J. & D. R. S. Lean, 1987. Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in lake St. George, Ontario. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 44: 598-604.
- Menezes, M. & Domingos, P. 1994. Flore planctonique d'une lagune tropicale (Brésil). *Rev. Hydrobiol. Trop.* 27(3): 273-297.
- Nascimento, S. M. & S. M. F. O. Azevedo, 1998. Growth of *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (blue-green algae) on different nitrogen/phosphorus ratio - ecophysiological approach. *Verh. int. Ver. Limnol.* 26: 1764-1765.
- Nürnberg, G. K., 1996. Trophic state of clear and colored, soft-and hardwater lakes with special consideration of nutrients, anoxia, phytoplankton and fishes. *J. Lakes Res. Manag.* 12: 432-447.
- OECD, 1982. *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. OECD, Paris: 145 pp.
- Orlík, K., 1994. *Phytoplankton Ecology. Determining factors for the distribution of phytoplankton in freshwater and the sea*. Ministry of the Environment, Denmark: 183 pp.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 107. Monogr. Stud.: 563-593.
- Padisák, J. & C. S. Reynolds, 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia* 384: 41-53.
- Paerl, H. W., 1988. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In Sandgren, C. D. (ed.), *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 261-315.
- Paranhos, R., 1996. Alguns métodos para análise da água. *Cadernos Didáticos UFRJ* 19. Rio de Janeiro: 200 pp.
- Pettersson, K., E. Herlitz & V. Istvanovics, 1993. The role of *Gloeo-trichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. *Hydrobiologia* 253: 123-129.
- Prézing, M., S. Herodek, L. Vörös & I. Kóbor, 1996. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Balaton. *Arch. Hydrobiol.* 136: 553-562.
- Ramberg, L., 1987. Phytoplankton succession in the Sanyati basin, Lake Kariba. *Hydrobiologia* 153: 193-202.
- Reynolds, C. S., 1984. Phytoplankton periodicity: the interaction of form, function and environmental variability. *Freshwat. Biol.* 14: 111-142.
- Reynolds, C. S., 1987. Cyanobacterial water-blooms. In Callow, J. (ed.), *Advances in Botanical Research*, Vol. 13. Academic Press, London: 67-143.
- Reynolds, C. S., 1988. Functional morphology and adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In Sandgren, C. D. (ed.), *Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 388-433.
- Reynolds, C. S., 1997. Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. Ecology Institute, Germany: 371 pp.
- Sant'Anna, C. L., L. Sormus, A. Tucci & M. T. P. Azevedo, 1997. *Variação sazonal do fitoplâncton do Lago das Garças*. São Paulo, SP. *Hoehnea* 24: 67-86.
- Shapiro, J., 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. int. Ver. Limnol.* 24: 38-54.
- Smith, V., 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221: 669-671.
- Smith, V., 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 43: 148-153.
- Sommer, U., 1988. Growth and survival strategies of planktonic diatoms. In Sandgren, C. D. (ed.), *Growth and Survival Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 227-260.
- Tilman, D., R. Kiesling, R. Sterner, S. Kilham & F. A. Johnson, 1986. Green, blue-green and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.* 106: 473-485.
- Trimbee, A. M. & E. E. Prepas, 1987. Evaluation of total phosphorus as a predictor of the relative biomass of blue-green algae with emphasis on Alberta lakes. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 44: 1337-1342.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-methodik. *Ver. int. Ver. Limnol.* 9: 1-38.
- Van den Hoek, C., D. G. Mann & H. M. Jahns, 1997. *An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge: 627 pp.
- Watson, S. B., E. McCauley & J. A. Downing, 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.* 42: 487-495.
- Zevenboom, W. & L. R. Mur, 1980. N₂-fixing cyanobacteria: Why they do not become dominant in Dutch, hypertrophic lakes. *Dev. Hydrobiol.* 2: 123-130.
- Zhang, Y. & E. E. Prepas, 1996. Regulation of the dominance of planktonic diatoms and cyanobacteria in four eutrophic hardwater lakes by nutrients, water column stability and temperature. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 53: 621-633.