

VI-099 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS COM DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE

Aline Domingues Batista

Graduanda em Química- Bacharelado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Emília Kiyomi Kuroda⁽¹⁾

Engenheira Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo – EESC-USP. Mestre e doutora em Hidráulica e Saneamento pela mesma instituição. Pós-doutora pela Meijo University, Japão. Professora do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da UEL.

Jandira Damaris Campos Pozzetti

Engenheira Ambiental pela Faculdades Adamantinenses Integradas – FAI. Mestranda em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Laís Yuko Suzuki

Graduanda em Engenharia Civil na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Flávia Kawahigashi

Química pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento pela mesma instituição.

Elisa Yoko Hirooka

Farmacêutica Bioquímica e Mestre em Ciência de Alimentos pela UEL-Londrina, Doutorado em Engenharia de Alimentos pela FEA-UNICAMP e Pós-Doutora em Science University of Tokyo, Meijo University.

Odete Rocha

Bióloga pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Mestrado em Ecologia pela Universidade de São Paulo – USP. Doutorado em Zoology pela University of London. Professora titular do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos e professora colaboradora sem vínculo empregatício da Escola de Engenharia de São Carlos (Universidade de São Paulo).

Endereço⁽¹⁾: Universidade Estadual de Londrina – UEL. Centro de Tecnologia e Urbanismo – CTU. Departamento de Construção Civil – DCCi. Rod. Celso Garcia Cid PR445 Km380 Campus Universitário. Cx Postal 6001 CEP 86051-990. Fone:+55 (43) 3371 4455 e +55 (43) 33715826 (lab) Email: ekkuroda@uel.br

RESUMO

O aumento da concentração de nutrientes nos ecossistemas aquáticos principalmente com nitrogênio e fósforo, pode ocasionar a eutrofização dos corpos de água. Certas condições climáticas podem conduzir à quebra do equilíbrio biológico do meio aquático e favorecer o aparecimento de florações ou “blooms” de cianobactérias, com alterações substanciais na qualidade da água ou efluente. O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está associado às hepatotoxinas, com destaque às microcistinas – MCs. Os bioensaios foram introduzidos na Resolução nº. 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA estabelecendo que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios de ecotoxicidade padronizados utilizando organismos aquáticos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade de extratos de três cepas de cianobactérias / *Microcystis*, uma não tóxica *M. sp. NPDC*, e duas cepas comprovadamente tóxicas, *M. sp. TAC95* e *M. sp. NPLJ4*, com diferentes organismos-teste: *Artemia salina*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*. Os valores obtidos de CL50 e CE50 indicaram que para os organismos utilizados a ordem crescente de toxicidade correspondente aos extratos das cepas foi NPDC, NPLJ4 e TAC95.

PALAVRAS-CHAVE: *Microcystis*, microcistinas, ensaios de ecotoxicidade, organismos aquáticos.

INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de nutrientes nos ecossistemas aquáticos principalmente com nitrogênio e fósforo, pode ocasionar a eutrofização dos corpos de água, que pode ocorrer de forma natural (processo lento, porém contínuo) ou artificial (decorrente de atividades antrópicas). Sob certas condições de temperatura, incidência de luz e velocidade de ventos, essa condição pode conduzir à quebra do equilíbrio biológico do meio aquático e favorecer o aparecimento de florações ou “blooms” de determinadas espécies fitoplancônicas, com alterações

substanciais na qualidade da água incluindo: redução do oxigênio dissolvido, perda das qualidades cênicas, morte extensiva de peixes e aumento do custo de tratamento de águas para abastecimento (AZEVEDO, 1998).

Entre os fatores que levam as cianobactérias a predominarem sobre os outros grupos fitoplanctônicos (microalgas), destacam-se as características fisiológicas pelas quais as cianobactérias assimilam os nutrientes (N e P) do meio aquático. De maneira geral, as cianobactérias são menos eficientes na assimilação desses nutrientes do que as microalgas (algas verdes ou diatomáceas, por exemplo), que, em condições normais, crescem com maior facilidade e intensidade. No entanto, ao produzir uma descarga excessiva de nutrientes nos reservatórios, o homem propicia uma maior oferta desses nutrientes, facilitando assim, a assimilação dos mesmos com predominância das cianobactérias (FUNASA, 2003).

São conhecidos aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias, sendo que 46 espécies já foram identificadas como potencialmente tóxicas aos vertebrados (MONDARDO, SENS, FILHO, 2006). Os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Umezakia* podem formar florações com conseqüente liberação de toxinas (cianotoxinas) no meio aquático através da lise ou senescência celular (CHORUS & BARTRAM, 1999; OLIVEIRA, 2003; MULLER, RODRIGUEZ E CYBIS, 2009).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está associado às hepatotoxinas, cujas espécies já identificadas como produtoras estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (REBOUÇAS, BRAGA E TUNDISI, 2006).

Além de ocorrerem em lagos, rios e reservatórios de água doce e águas costeiras, as cianobactérias também podem estar presentes nas lagoas de estabilização para tratamento biológico dos esgotos provenientes de áreas urbanas e estabelecimentos comerciais e domésticos. Esta técnica de tratamento apresenta baixo custo, simplicidade operacional, boa eficiência para remoção de matéria orgânica e patógenos e é caracterizada pelo crescimento excessivo de organismos fitoplânctônicos cujo grupo comumente encontrado são as algas verdes (clorofíceas) e as cianobactérias (GODOY, 2007).

Os bioensaios foram introduzidos na Resolução nº. 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA estabelecendo que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios de ecotoxicidade padronizados utilizando organismos aquáticos.

Devido à complexidade do ambiente aquático e ao grande número de processos aos quais está sujeito um contaminante, é difícil extrapolar para escala ambiental as informações provenientes dos testes de toxicidade realizados em laboratório. Além disso, deve-se considerar que, à princípio, devido às diversas condições abióticas e bióticas presentes nos ecossistemas aquáticos, não há nenhum organismo modelo nem comunidade ecológica que possa ser usado para avaliar todos os efeitos possíveis sobre esses ecossistemas. Para que os efeitos em escala ambiental pudessem ser preditos a partir dos testes de toxicidade, as informações toxicológicas deveriam ser conectadas a modelos populacionais, pois envolve uma série de restrições, principalmente de custo e tempo e requer a atuação de equipe técnica multidisciplinar. Apesar disso, os testes de toxicidade realizados sob condições controladas e padronizadas vêm servindo como fonte de informações para avaliar os efeitos ecotoxicológicos de contaminantes (MAGALHÃES, FERRÃO FILHO, 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas e extratos de cianobactérias

Nesse estudo foram utilizadas 2 cepas de *Microcystis* comprovadamente toxigênicas: TAC95 (predominantemente produtora de microcistina - em elevadas concentrações) e NPLJ4 (predominantemente produtora de [D-Leu1]MC-LR em elevadas concentrações) e NPDC (não produtora de MCs em concentrações significativas).

Os cultivos foram realizados em meio ASM-1 estéril em erlenmeyers com volume de 3L mantidos em incubadora de BOD, sob aeração contínua e condições controladas de temperatura $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e iluminação da ordem de $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 h.d⁻¹.

Após 20 a 30 dias (final da fase de crescimento exponencial), as culturas foram concentradas por centrifugação a 1000 g por 10 min a 4°C, e o pellet obtido, congelado a -20°C e liofilizado. O material liofilizado foi submetido à extração pela repetição de 3 séries de congelamento / descongelamento, filtrado em membrana com porosidade média de 0,45 µm e mantido a -20°C até o uso.

A quantificação de microcistinas - MCs totais dos extratos foi realizada por imunoenensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) / kits de placas (Beacon Analytical Systems Inc.). As amostras foram previamente filtradas em filtro tipo GF/C ou similar e em seguida, diluídas em água ultrapura de forma a possibilitar a quantificação pela curva de calibração com faixa entre 0 e 2,0 µg.L⁻¹ de MCs totais. O limite de detecção do método é de 0,16 µg.L⁻¹.

Ensaio de ecotoxicidade em *Artemia salina*

Devido à inexistência de um protocolo padronizado para ensaio de ecotoxicidade em *Artemia salina*, os testes foram baseados na norma da Petrobrás N-2588 (1996) com adaptações, após testes preliminares sobre o comportamento desse organismo em função da variação de alguns parâmetros e condições. De acordo com os resultados obtidos foi verificado que o teste deve ser realizado com o ajuste do pH das amostras para valores entre 8-9, além de manter condição mínima de 10% de solução salina para que não haja comprometimento na interpretação dos resultados em relação à toxicidade da amostra testada.

Para a eclosão dos ovos de *A. salina* (de alta eclosão da Maramar Aquacultura Com. Imp. Exp. Ltda – ME), estes foram incubados por 48 horas em solução salina artificial com pH entre 8 e 9 e à temperatura de 27° a 30° C com iluminação constante de 60 – 100 W. Para isso, foi utilizada uma caixa plástica compartimentada por divisória contendo orifícios (da ordem de 2 mm) uniformemente distribuídos, de forma a permitir a passagem de náuplios de *A. salina*, por fototropismo, após impedimento de passagem de luz em um dos compartimentos com papel alumínio.

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 10 mL em 4 réplicas para cada uma das concentrações de extrato de cianobactéria limitados a 90% com ajuste de pH para 8-9, controles negativo e positivo para um volume total de 5 mL. Após a preparação de todos os tubos com as concentrações preestabelecidas, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de diâmetro adequado e ponta arredondada, colocou-se 10 náuplios de *A. salina* por tubo, e estes foram mantidos sob iluminação à temperatura de 27° a 30° C por 24 h. O controle negativo (branco) foi realizado com a solução salina e o controle positivo, com solução de dicromato de potássio em meio salino com concentração de 0,2 g.L⁻¹. Após a exposição de 24 h, o número de organismos vivos e mortos em cada tubo era quantificado para posteriormente, determinar a concentração da amostra que causou mortalidade de 50% dos organismos após exposição de 24 h – CL50_{24h} nas condições do teste. A CL50_{24h} foi obtida por cálculo estatístico usando o programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) com intervalo de confiança de 95%.

Manutenção e cultivo de *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*

As cepas de *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* foram mantidas à temperatura controlada de 25° C e iluminação de 35 µE.m⁻².s⁻¹ com fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ em incubadora BOD (Tecnal – TE371). Os cultivos foram realizados seguindo normas padronizadas da ABNT, 2005- NBR 13373 para *C. dubia* e da ABNT, 2004- NBR 12713 para *D. magna* em meios específicos (água reconstituída e M4, respectivamente) previamente aerados por um período mínimo de 12 h antes da sua utilização. A renovação da água de cultivo das culturas estoque e a alimentação foi realizada 3 vezes por semana.

Os organismos foram alimentados com uma suspensão algácea de *Pseudokirchneriella subcapitata* concentrados na fase exponencial de crescimento, para uma concentração de 1x10⁵ cél.mL⁻¹.org⁻¹ e alimento composto constituído de levedura (fermento biológico seco dissolvido em água deionizada) e ração de peixe Tetramim fermentada (na proporção de 1:1) para uma concentração de 1 mL.L⁻¹.

Ensaio de ecotoxicidade em *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*

Os ensaios de ecotoxicidade utilizando *C. dubia* e *D. magna* consistiram na exposição, em 3 réplicas, de 5 neonatas com idade entre 6 e 24 h para diferentes diluições das amostras de extratos de cianobactérias com o

meio específico para volume total de 10 mL em placas de cultivo celular em polipropileno (TPP). Os experimentos foram mantidos a temperatura controlada de 25° C, sem iluminação e alimentação.

Os ensaios foram validados pelos controles negativo (água reconstituída) e positivo (dicromato de potássio 0,2g.L⁻¹) e atendimento aos valores preestabelecidos dos parâmetros: pH entre 5 e 9, condutividade, dureza e oxigênio dissolvido (OD) superior a 1 e 3 mg.L⁻¹ para *C. dubia* e *D. magna*, respectivamente.

Após o período de exposição (24 e 48 horas) foi realizada a contagem dos organismos imóveis ou mortos em estereoscópio (Motic - SMZ140 FBLED) e seus resultados foram expressos como concentração efetiva mediana da amostra que causa efeito a 50% da população exposta após 24 h – CE50_{24h} e 48 h – CE50_{48h} obtidas por cálculo estatístico usando o programa Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (HAMILTON et al. 1977). Finalmente, os resultados dos ensaios foram validados se a porcentagem de organismos imóveis ou mortos no controle negativo resultasse inferior a 10% (ABNT, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de ecotoxicidade aguda em *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *Artemia salina* foram avaliados os efeitos de imobilidade e/ou letalidade após 24 e 48 h de exposição para *C. dubia* e *D. magna* e de letalidade após 24 h de exposição para *A. salina*.

Nas Figuras 1 e 2 são apresentados os resultados de CL50_{24h} (Concentração que causa efeito letal a 50% dos organismos em até 24h) , CE50_{24h} e CE50_{48h} (Concentração que causa efeito a 50% dos organismos em 24 e/ou 48h) obtidos para os ensaios de ecotoxicidade em *A. salina*, *D. magna* e *C. dubia* para os extratos de cianobactérias *Microcystis*: *M. sp.* NPDC, *M. sp.* NPLJ4 e *M. sp.* TAC95, respectivamente.

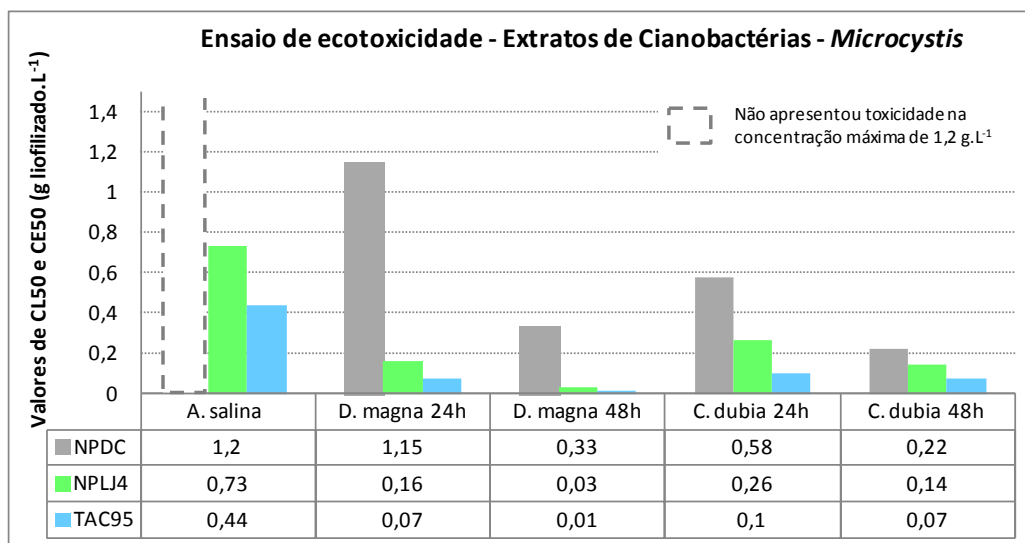


Figura 1 - Valores de CL50_{24h} (*Artemia salina*) e CE50_{24h} e CE50_{48h} (*Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*) em g.L⁻¹ de liofilizado das cepas de *Microcystis* NPDC, NPLJ4 e TAC95.

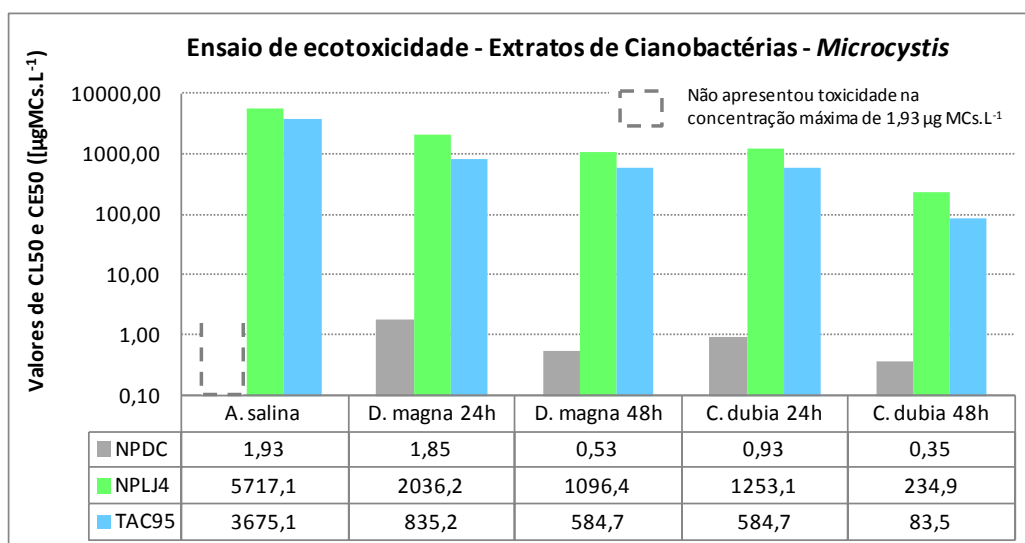


Figura 2 - Valores de CL50_{24h} (*Artemia salina*) e CE50_{24h} e CE50_{48h} (*Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*) em µg MCs.L⁻¹ das cepas de *Microcystis* NPDC, NPLJ4 e TAC95.

Na Tabela 1 são apresentados os valores de CE50 e CL50 em concentração de liofilizado (mg liof.L⁻¹) e em concentração de microcistinas - MCs (µg MCs.L⁻¹) obtidos nos ensaios de ecotoxicidade em *A. salina*, *D. magna* e *C. dubia* para os extratos de cianobactérias *Microcystis*: *M. sp.* NPDC, *M. sp.* NPLJ4 e *M. sp.* TAC95.

Tabela 1 - Valores de CE50 e CL50 em concentração de liofilizado (mg liof.L⁻¹) e em concentração de MCs (µg MC.L⁻¹) obtidos nos ensaios de ecotoxicidade em *A. salina*, *D. magna* e *C. dubia* para os extratos de cianobactérias / *Microcystis*: *M. sp.* NPDC, *M. sp.* TAC95 e *M. sp.* NPLJ4

Organismos-teste	<i>Microcystis sp.</i> NPDC		<i>Microcystis sp.</i> NPLJ4		<i>Microcystis sp.</i> TAC95		Referência
	[mg liof.L ⁻¹]	[µg MCs.L ⁻¹]	[mg liof.L ⁻¹]	[µg MCs.L ⁻¹]	[mg liof.L ⁻¹]	[µg MCs.L ⁻¹]	
<i>A. salina</i> CL50 _{24h}	>1200	n.d.	730,0	5717,1	440,0	3675,1	8000 e 2000 ^(a) (Lindsay, 2006)
<i>D. magna</i> CE50 _{24h}	1150	1,9	260,0	2036,2	100,0	835,2	3750 e 770 ^(b) (Ferrão Filho, 2009)
<i>D. magna</i> CE50 _{48h}	330	0,5	140,0	1096,4	70,0	584,7	
<i>C. dubia</i> CE50 _{24h}	580	0,9	160,0	1253,1	70,0	584,7	1210 e 220 ^(c) (Ferrão Filho, 2009)
<i>C. dubia</i> CE50 _{48h}	220	0,4	30,0	234,9	10,0	83,5	

n.d.: toxicidade CL50_{24h} não detectada;

(a): Faixa de valores de CL50_{24h} obtida por Lindsay (2006) com *A. salina* para cepa tóxica de *M. aeruginosa* PCC7813;

(b): Faixa de valores de CE50_{24h} obtida por Ferrão Filho (2009) com *Daphnia pulicaria* para cepa tóxica de *M. aeruginosa* NPLJ3;

(c): Faixa de valores de CE50_{24h} obtida por Ferrão Filho (2009) com *Daphnia pulex* para cepa tóxica de *M. aeruginosa* NPLJ3.

Não foi possível determinar a CL50_{24h} com *Artemia salina* para o extrato da cepa NPDC para as concentrações testadas (100 a 1200 mg liof.L⁻¹ ou 0,16 a 1,9 µg MCs.L⁻¹).

Os resultados indicaram que, em geral, para os organismos testados, a toxicidade do extrato da cepa TAC95 foi maior do que a do extrato de NPLJ4, sendo este, maior do que a do extrato de NPDC.

- Comparando-se os valores de CE50_{24h} em concentração de liofilizado com *D. magna* para os extratos das cepas NPLJ4, TAC95 e NPDC, pode-se observar que, de forma geral, a toxicidade do extrato da cepa TAC95 resultou cerca de 2,2 vezes maior do que a do extrato de NPLJ4;

- a toxicidade do extrato da cepa NPLJ4 resultou cerca de 4,3 vezes maior do que a do extrato de NPDC.

Segundo Ferrão Filho (2009), dentre as cianotoxinas, as microcistinas foram as mais estudadas quanto ao seu efeito sobre o zooplâncton (DEMOTT et al. 1991, JUNGSMANN & BENNDORF 1994). Apesar das evidências de que as microcistinas – MCs causam efeitos adversos em diversas espécies de zooplâncton, outros compostos produzidos pelas cianobactérias podem estar relacionados com a toxicidade para o zooplâncton. Os valores de CE50 obtidos neste trabalho com *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* para o extrato da cepa NPDC, com baixas concentrações de MCs (entre 0,4 e 1,9 µg MCs.L⁻¹) confirmam esta constatação, uma vez que foi constatada toxicidade, mesmo para o extrato da cepa NPDC, produtora de MCs em baixas concentrações.

Em relação as concentrações de MCs presentes nos extratos das cepas de cianobactérias / *Microcystis*, a resposta de toxicidade obtida para *A. salina* foi a mais coerente dentre os organismos-teste utilizados, uma vez que não foi possível determinar o valor de CL50_{24h} para a cepa NPDC e os valores de CL50_{24h} para as cepas NPLJ4 e TAC95 foram condizentes com as respostas obtidas para os demais organismos-teste.

CONCLUSÕES

Em relação aos ensaios de ecotoxicidade em *Artemia salina*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* para os extratos de cianobactérias *Microcystis*: *M. sp.* NPDC, *M. sp.* NPLJ4 e *M. sp.* TAC95, pode-se concluir que:

- Os valores obtidos de CL50 e CE50 indicaram que para os organismos utilizados *A. salina*, *D. magna* e *C. dubia* a ordem crescente de toxicidade correspondente aos extratos das cepas foi NPDC, NPLJ4 e TAC95;
- O extrato da cepa *M. sp.* NPDC, com concentrações de liofilizado entre 220 e 1150 mg liof. L⁻¹ foi tóxico para os organismos-teste *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, provavelmente devido a outros compostos presentes no extrato, uma vez que as concentrações de MCs resultaram reduzidas (0,4 a 1,9 µg MCs.L⁻¹);
- Em relação as concentrações de MCs presentes nos extratos das cepas de cianobactérias / *Microcystis*, a resposta de toxicidade obtida para *A. salina* foi a mais coerente dentre os organismos-teste utilizados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, AWWA, WEF (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF) / 21ª edição.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). NBR 13373. São Paulo, 2005.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). NBR 12713. São Paulo, 2004.
4. AZEVEDO, S.M.F.O 1998. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Consequências para a saúde pública. Medicina on line, 3(1):1-19.
5. BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011**. Complementa e altera a Resolução no 357 de 2005, Brasília, 2011.
6. CHORUS, I.; BARTRAM, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 416p.
7. DEMOTT, W.R.; ZHANG, Q.X. & CARMICHAEL, W.W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. Limnology and Oceanography, 36: 1346-1357.

8. Ferrão-Filho, A.S.; Azevedo, S.M.F.O. & DeMott, W.R. 2000. Effects of toxic and nontoxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 43: 1-19.
9. FERRÃO FILHO, A.S. **Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos.** *Oecol. Bras.*, 13(2): 272-312, 2009.
10. GODOY, O. A. **Avaliação da Presença de Cianobactérias em Efluentes de Sistema de Tratamento de Esgotos Sanitários por Lagoas de Estabilização Associadas a Tratamento Físico-Químico.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Hidráulica e Sanitária. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
11. HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentration in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology*, Easton, v.11, n.7, p.714-719.
12. JUNGSMANN, D. & BENNDORF, J. 1994. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins. *Freshwater Biology*, 32: 13–20.
13. Lindsay, J.; Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2006. Protection against the toxicity of *microcystin-LR* and *cylindrospermopsin* in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon*, 48: 995-1001.
14. MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** *Oecol. Bras.* 12(3), p. 355-381, 2008.
15. MONDARDO, R. I. SENS, M. L. FILHO, L. C. M. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n 4 out/dez 2006.
16. MÜLLER, C. C. RODRIGUEZ, M. T. R, CYBIS, L. F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, jan/mar 2009.
17. OLIVEIRA, M. C. B. Cianobactéria invasora, Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil, **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, Janeiro/Junho 2003.
18. Petrobrás N-2588: Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia* sp. CONTEC - Comissão de normas técnicas, 1996.
19. REBOUÇAS, A. C. BRAGA, B. TUNDISI, J. G. **Águas Doces no Brasil Capital Ecológico, Uso e Conservação**, 3ª Edição, São Paulo: Editora Escrituras, 2006.