

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM *LIMNOPERNA
FORTUNEI* (DUNKER, 1857) NA PRESENÇA DE
ALGAS VERDES E CIANOBACTÉRIAS**

Luíza de Oliveira Hudson

Belo Horizonte

2014

Luíza de Oliveira Hudson

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM *LIMNOPERNA
FORTUNEI* (DUNKER, 1857) NA PRESENÇA DE
ALGAS VERDES E CIANOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientadora: Alessandra Giani
Co-orientadora: Teofânia Vidigal

**Belo Horizonte
2014**

“A cada dia que vivo, mais me
convenço de que o desperdício da
vida está no amor que não damos,
nas forças que não usamos,
na prudência egoísta que nada
arrisca, e que, esquivando-se do
sofrimento, perdemos também a
felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, força e proteção ao longo de toda minha jornada e por mais uma conquista.

À toda minha família, em especial minha mãe querida Soraya e ao meu padrasto José Ailton, por acreditarem em mim mais uma vez e sempre me incentivarem a investir no meu estudo. Pelo apoio, amor e consolo nas horas difíceis.

Ao meu noivo Leandro, pelo amor, companheirismo e por entender as horas de ausência e os momentos de estresse.

À minha orientadora Alessandra Giani, pela oportunidade, pelo conhecimento adquirido e por enfrentar junto comigo todos os obstáculos ao longo dessa caminhada.

À Teofânia Vidigal pela co-orientação, por toda a estrutura do LELf oferecida para realização dos trabalhos e pela coleta dos mexilhões utilizados neste estudo.

A todo o pessoal do Laboratório de Ficologia e do LELf por me receberem tão bem, me ajudarem sempre que foi preciso e me proporcionarem bons momentos ao longo desses anos.

À Maria Kolman e à Simone Mitre pelas inúmeras ajudas, discussões e troca de experiências, mas principalmente pela amizade e pelas risadas, que tornaram meus dias de trabalho mais felizes.

À técnica Elenice por cuidar tão bem do banco de cultura de algas do Lab. de Ficologia e me fornecer as cepas utilizadas neste trabalho.

À técnica Dalva por me acompanhar desde o primeiro dia em todos os experimentos realizados. Pela dedicação e carinho ao cuidar dos animais, das culturas e de todos os detalhes que eu precisava para os experimentos. Sem você tudo teria sido bem mais difícil!

Ao Daniel Pereira pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Juliano Michel pela ajuda nos experimentos de toxicidade crônica.

Ao prof. Jairo Pinheiro por disponibilizar seu laboratório e toda estrutura necessária para realização dos testes de cálcio e glicogênio.

À CEMIG pelo apoio financeiro e ao pessoal da GA/IP pela oportunidade do estágio realizado na área permitindo que eu tivesse meu primeiro contato com o mexilhão dourado. Em especial à amiga Helen Mota pelo incentivo à realização do mestrado.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que de certa forma me incentivaram na realização desse sonho, nas trocas de experiência e com palavras de apoio nos momentos difíceis, meu muito obrigado, vocês todos fazem parte dessa conquista!!!

RESUMO

Limnoperna fortunei é um bivalve filtrador de água doce, nativo do Sudeste da Ásia, que chegou à América do Sul pela água de lastro de navios mercantes. Identificado pela primeira vez na Argentina (1991) na bacia do rio da Plata vem se expandindo em alta velocidade e já pode ser encontrado em diversos estados brasileiros. Muito semelhante ao bivalve *Dreissena polymorpha*, também asiático, invasor da América do Norte e Europa, apresenta larva planctônica livre natante, maturação sexual rápida com altas taxas de fecundação e ciclo de vida curto, além de ampla tolerância a variações ambientais. Essas características contribuem para a rápida dispersão e o sucesso adaptativo dessa espécie. É um filtrador eficiente capaz de reduzir o fitoplâncton da coluna d'água e enriquecer o substrato com a produção de pseudofezes. Além das alterações ambientais pode causar prejuízos econômicos como entupimento de canos e parada de máquinas em hidrelétricas e indústrias que utilizam de água bruta. As cianobactérias também são um problema constante em lagos e reservatórios, cada vez mais eutrofizados como consequência da atividade humana. Dessa forma, este estudo avaliou a taxa de filtração de *L. fortunei* na presença de algumas cepas de algas verdes, *Chlorella* sp, *Ankistrodesmus* sp. e *Chlamydomonas* sp, e de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa*, cepas tóxica produtora de microcistina e não tóxica, e *Anabaena* sp. Os resultados mostraram que o mexilhão dourado foi capaz de filtrar com eficiência *M. aeruginosa* da mesma forma que as algas verdes. O mexilhão apresentou taxas de filtração baixas na presença de *Anabaena* sp., o que pode estar relacionado ao formato filamentosos da cepa e à possível presença de saxitoxina. No experimento de longa duração (24 dias) foi analisada a concentração de cálcio e de glicogênio em *L. fortunei* em jejum ou se alimentando de *M. aeruginosa* tóxica. Os valores de cálcio presentes nas conchas dos mexilhões não sofreram alteração em nenhum grupo durante o período

experimental. As taxas de glicogênio foram baixas no grupo que permaneceu em jejum, como esperado (média de 0.197 ± 0.001 mg glicose/g tecido no 7º dia), mas no grupo tratado com *M. aeruginosa* (média de 2.077 ± 0.056 mg glicose/g tecido no 14º dia) os valores foram semelhantes ao controle (média 1.655 ± 0.084). Os resultados mostraram que a cianobactéria, mesmo tóxica, quando fornecida como alimento, é facilmente ingerida por indivíduos adultos de *L. fortunei* e não afeta certos parâmetros fisiológicos básicos, mostrando resistência do molusco à cianotoxina microcistina, como já havia sido observado por outros autores em *D. polymorpha*.

Palavras chaves: *Limnoperna fortunei*, taxa de filtração, clorofitas, cianobactérias

ABSTRACT

Limnoperna fortunei is a freshwater filter-feeding mussel native to Southeast Asia that was introduced to South America by ballast water in merchant ships. It was discovered in Argentina in 1991, at Rio de la Plata estuary. Since then, it can be found in many Brazilian waterbodies. Very similar to the bivalve *Dreissena polymorpha*, an invasive mussel from North America and Europe, both present planktonic larvae, early sexual maturity, high fecundity and wide environmental tolerance. Those characteristics allow them to overcome the transitions to be a successful invader into the new environment. They are excellent filter-feeders capable to reduce the fitoplankton biomass in watersystems and to enrich the substrate by the production of pseudofeces. Beside environmental problems they can cause economic losses because of their gregarious behavior, like the obstruction of pipes in industries and power plants. Cyanobacteria are also a constant problem in lakes and reservoir, which became eutrophic due to intense human activities. This study aimed to estimate *L. fortunei* filtration rates in the presence of some green algae, *Chlorella* sp, *Ankistrodesmus* sp. and *Chlamydomonas* sp, and the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*, toxic and non-toxic strains, and *Anabaena* sp. The results showed that the golden mussel was capable of filtering *M. aeruginosa* at rates similar to the green algae. On the other hand, filtration rates were lower when feeding on *Anabaena* sp. Strains, maybe because *Anabaena* has a filamentous morphology and may produce saxitoxins. During a long term feeding experiment (24 days) on *Microcystis*, the concentration of calcium and glycogen were analyzed in *L. fortunei*. The calcium values present in the mussel's shell were not different among experimental treatments. The glycogen concentration was lower in the starved group, as expected, but in the group feeding on *M. aeruginosa*, glycogen was similar to the control group. The results showed that toxic cyanobacteria when offered

as a food with intact cells are easily ingested by adults of zebra mussel. Some physiologic parameters were also not affected by the toxin, showing the resistance of *L. fortunei* to cyanotoxins, as it was already been shown by others authors for *D. polymorpha*.

Key words: *Limnoperna fortunei*, filtration rates, green algae, cyanobacteria

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Seleção dos animais mais ativos.....	28
Fig. 2: Animais selecionados em rede de náilon.....	28
Fig. 3: Experimento de filtração com shaker.....	33
Fig. 4: Experimento de filtração com agitador magnético.....	34
Fig. 5: <i>L. fortunei</i> separados para experimento de toxicidade crônica.....	36
Fig. 6: Mexilhões em B.O.D. durante experimento toxicidade crônica.....	36
Fig. 7: Teste de metodologia utilizando aeração simples.....	43
Fig. 8: Teste de metodologia utilizando aeração dupla, shaker e agitador magnético.....	43
Fig. 9: Teste de metodologia na presença de <i>L. fortunei</i>	45
Fig. 10: Determinação da concentração de alimento utilizando <i>Ankistrodesmus</i> sp. e aeração simples.....	46
Fig. 11: Determinação da concentração de alimento utilizando <i>Ankistrodesmus</i> sp. e agitador magnético.....	47
Fig. 12: Taxa de filtração de <i>L. fortunei</i> na presença de algas verdes.....	49
Fig. 13: Taxa de filtração de <i>L. fortunei</i> na presença de <i>M. aeruginosa</i>	50
Fig. 14: Taxa de filtração de <i>L. fortunei</i> na presença de <i>Anabaena</i> sp.....	51
Fig. 15: Média da produção de pseudofezes por indivíduo.....	52
Fig. 16: Quantificação de cálcio nas conchas nos grupos tratado e controle	54

Fig. 17: Quantificação de glicogênio nos grupos tratado e controle.....55

LISTA DE TABELAS

Tab. 1: Algas selecionadas para experimento de taxa de filtração.....	30
Tab. 2: Peso seco de <i>Limnoperna fortunei</i>	48
Tab. 3: Parâmetros de qualidade da água analisados.....	53

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 OBJETIVOS.....	24
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Estrutura do laboratório.....	25
3.2 Coleta e manutenção dos animais.....	26
3.3 Desenvolvimento dos experimentos.....	27
3.3.4 Taxa de filtração.....	31
3.3.5 Experimento toxicidade.....	35
4.0 RESULTADOS.....	42
4.1 Teste de metodologia.....	42
4.2 Peso seco.....	47
4.3 Taxa de filtração.....	48
4.4 Experimento toxicidade crônica.....	52
5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	56
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1.0 INTRODUÇÃO

A crescente globalização presenciada nos dias atuais e o aumento do comércio e dos transportes fluviais têm favorecido cada vez mais a ocorrência de bioinvasores e os impactos ambientais no ecossistema em que eles se encontram. (IUCN, 2000; Lockwood et al., 2007). Segundo IUCN (2000), a introdução de espécies exóticas invasoras tem sido considerada uma das principais causas da perda da biodiversidade. Uma espécie é considerada exótica quando é encontrada num ambiente que não é o seu de origem e invasora quando é capaz de se estabelecer e reproduzir nesse novo ambiente (Davis & Thompson, 2000; Darrigran & Damborenea, 2009). De acordo com Elton (1958), esse estabelecimento ocorre de forma mais fácil em ambientes perturbados, onde o conjunto de competidores, predadores e parasitas não está em equilíbrio.

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae), também conhecido como mexilhão dourado pela tonalidade marrom-dourada de sua concha, é um molusco bivalve de água doce e um exemplo de espécie exótica invasora da região Neotropical (Darrigran & Damborenea, 2011). Originário dos rios do Sudeste da Ásia e China foi identificado pela primeira vez na América do Sul em 1991 no estuário do Rio da Plata na Argentina (Pastorino et al., 1993). Darrigran & Pastorino (1995) sugerem que essa invasão ocorreu de forma não intencional através da água de lastro de navios mercantes. Desde então, a invasão de *L. fortunei* vem ocorrendo a uma velocidade média de 240 km/ano (Darrigran et al., 2007) e hoje o mexilhão já pode ser encontrado em rios no Brasil, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Darrigran, 2002; Sylvester et al., 2005).

No Brasil, foi identificado pela primeira vez em 1998 no lago Guaíba, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Mansur et al., 1999). Hoje já está presente em outros estados como

Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Minas Gerais (Pareschi et al, 2008; Oliveira et al, 2010).

Limnoperna fortunei possui modo de vida epifaunal e comportamento gregário, sendo capaz de se fixar nos mais diversos substratos rígidos (Morton, 1973). Sua fixação ocorre pela produção de fibras proteicas muito rígidas que formam uma estrutura denominada bisso. Assim como outras espécies invasoras, apresenta características que contribuem para seu sucesso adaptativo, como rápido crescimento, ciclo de vida curto e sua maturação sexual ocorre cedo com altas taxas de fecundação (Morton, 1973). É tolerante a variações ambientais podendo ser encontrado em temperaturas de 5°C (Magara et al., 2001) a 34°C, pH de 6.2 a 7.4 e 3.96 mg/L de Ca⁺⁺ (Darrigran, 2002). Sua larva planctônica livre natante também contribui para facilitar sua dispersão na corrente dos rios. Porém, ainda segundo Darrigran (2002), a maior dispersão de *L. fortunei* na América do Sul ocorreu contracorrente, associada à fixação do mexilhão em cascos de embarcações e diretamente relacionada à alta navegabilidade de rios como Paraná e Paraguai.

Denominado por alguns autores como “engenheiro do ecossistema” (Jones et al., 1997; Karatayev et al., 2002, 2007b), pela capacidade de modificar o ambiente em que se encontra, o mexilhão dourado é um bivalve com grande capacidade filtradora, causando sérios impactos na composição e abundância da comunidade fitoplanctônica e na ciclagem de nutrientes (Karatayev et al., 1997; Boltovskoy et al., 2009). A remoção do fitoplâncton da coluna d’água aumenta a transparência da água e a penetração de luz na região, permitindo crescimento de organismos fotossintetizantes como macrófitas e perifiton, porém diminui o oxigênio dissolvido e aumenta os níveis de amônia, nitrato e fosfato (Karatayev et al., 1997; Vanderploeg et al., 2002; Cataldo et al., 2005a). Há

ainda grande deposição de matéria orgânica e detritos no sedimento aumentando o assoreamento e alterando a comunidade bentônica (Karatayev et al., 1997).

Embora não apresentem relações taxonômicas, *L. fortunei* é muito parecido com *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Bivalvia: Dreissenidae), um bivalve exótico também proveniente da Ásia, que invadiu a Europa e América do Norte em meados de 1800 (Karatayev et al., 2007). Ambas as espécies possuem história de vida similar e compartilham características que as tornam espécies exóticas invasoras com alto impacto ambiental. *Dreissena polymorpha*, também conhecido como mexilhão zebra, vem sendo estudado há mais tempo que *L. fortunei* e seus estudos são a principal referência para a compreensão da biologia e do comportamento do mexilhão dourado, já que os estudos sobre este último ainda são recentes.

Além dos impactos ambientais, o mexilhão tem causado muitos impactos econômicos. O comportamento gregário desse bivalve (também conhecido como *macrofouling* ou *biofouling*) tem gerado inúmeros prejuízos a indústrias, hidrelétricas e sistemas de abastecimento de água que utilizam água bruta. Os mexilhões encrustam em canos e grades levando ao entupimento dos mesmos, ao aumento da corrosão e à diminuição do fluxo de água, obrigando as indústrias a pararem com frequência o maquinário para limpeza. Em hidrelétricas, canos de refrigeração podem entupir levando ao superaquecimento de máquinas, que precisam ser desligadas e deixam de produzir energia. A aglomeração em cascos de navios aumenta a resistência com a água, diminuindo a velocidade do navio e aumentando o tempo gasto na viagem e o consumo de combustível. A associação do mexilhão com atividades humanas também é um problema que contribui para aumentar a dispersão do mexilhão, que pode ser transportado em barcos e utensílios de pesca, em botas, redes, remos e boias por exemplo.

Dos vários problemas citados acima, a capacidade filtradora tem recebido maior atenção por parte dos estudiosos da área devido à mudança que causa na estrutura do fitoplâncton e na cadeia trófica, alterando conseqüentemente toda estrutura do ecossistema em que, tanto o mexilhão dourado quanto o mexilhão zebra, se encontram (Sylvester et al., 2005). Bivalves lamelibrânquios são filtradores eficientes e capazes de realizar uma filtragem seletiva das partículas em suspensão na coluna d'água, exercendo um papel importante na regulação da dinâmica dos ecossistemas aquáticos. As partículas selecionadas negativamente são envolvidas em um muco e expelidas na forma de pseudofeces. As partículas eliminadas nas pseudofeces na maioria das vezes não sofrem ação de nenhum composto metabólico, são viáveis e contribuem para o enriquecimento do sedimento favorecendo animais bentônicos (Baker, 1998; von Ruckert, 2004). Ainda não se sabe muito sobre os mecanismos que regulam a seleção das partículas filtradas por *L. fortunei* e *D. polymorpha*.

Segundo alguns autores, fatores como temperatura, concentração de alimento, tamanho e biomassa corporal podem influenciar a taxa de filtração de bivalves. Sylvester (2005) e Pestana (2009) mostraram que *L. fortunei* atinge taxas de filtração ótimas com a temperatura da água a 25°C. Sprung & Rose (1988) acrescentam ainda que a qualidade e a quantidade de alimento também são importantes na hora de estimar a taxa de filtração de bivalves. Em seu estudo com *D. polymorpha* filtrando a clorofita *Chlamydomonas* sp., concluíram que a maior taxa de filtração ocorre em concentrações mais baixas de alimento enquanto que a maior taxa de ingestão ocorre na presença de uma quantidade maior de alimento e a retenção com máxima eficiência ocorreu com partículas entre 5 e 35µm de diâmetro.

A alimentação em excesso é um fator negativo para a estimativa da taxa de filtração, já que pode acabar estimulando a produção de pseudofeces (Kjørboe & Møhlenberg, 1981;

Sprung & Rose, 1988). De acordo com dados reportados na literatura, as concentrações de alimento consideradas ideais para estudos com bivalves são até 10^5 partículas.mL⁻¹ (Owen, 1974) ou 2 mm³.L⁻¹ (Sprung & Rose, 1988).

Dados sobre a taxa de filtração do mexilhão dourado são considerados importantes para interpretação da dinâmica da filtração das partículas em suspensão e a produção de pseudofeces (balanço energético) (Sylvester et al., 2005), entretanto não se encontram na literatura estudos nessa área com descrição detalhada dos métodos utilizados.

A alta capacidade filtradora também se relaciona com a resistência a metais pesados, organoclorados e toxinas (por exemplo, cianotoxinas), que podem ser facilmente acumulados por *L. fortunei* e *D. polymorpha* causando uma biomagnificação na cadeia alimentar (Darrigran & Coppola, 1994; von Ruckert et al., 2004; Gazulha, 2011). Em uma análise abrangente, *L. fortunei* pode aumentar o risco de saúde humana por ser consumido por peixes (Montalto et al., 1999; Penchaszadeh et al., 2000), e estes são consumidos pelo homem juntamente com as toxinas.

Estudos mostram a coexistência de cianobactérias com *D. polymorpha* e alguns afirmam que o mexilhão zebra é capaz de diminuir a densidade de cianobactérias pela filtragem seletiva (Dionísio Pires et al., 2004). Outros, como Vanderploeg et al. (2001) e Juhel et al. (2006), afirmam o contrário, mostrando que *D. polymorpha* foi capaz de aumentar a densidade de cianobactérias no ambiente. Entretanto, Bastviken et al. (1998) afirmam que esses resultados variam de acordo com o ambiente e com a concentração de cianobactérias no mesmo.

As cianobactérias são organismos procariontes, muito primitivos e apresentam características tanto de algas quanto de bactérias. Pertencem ao reino *Bacteria*, mas são fotossintetizantes e liberam oxigênio (Castenholz & Waterbury, 1989). Apresentam

morfologia variada, podendo ser unicelular, colonial ou filamentosa com células variando de 1 µm até maiores que 40 µm. Além disso, podem se organizar na forma de cocos, bacilos ou filamentos, envoltos por bainha mucilaginosa ou não (Komarék et al.; 1999).

Possuem algumas características que as tornam capazes de habitar os ambientes mais diversos possíveis como a tolerância a altas temperaturas, altas irradiações de UV, dessecação, sulfeto livre e também a habilidades de usar baixas intensidades luminosas (Rapala & Sivonen, 1997). Além disso, algumas espécies apresentam aerótopos (vesículas de gás) que permitem a flutuação na coluna d'água e heterocitos que auxiliam na fixação de nitrogênio (Oberholster et al., 2003).

As cianobactérias estão amplamente distribuídas nos ecossistemas aquáticos e uma das grandes preocupações atuais é a capacidade que algumas espécies têm de formar florações em ambientes eutróficos e, de acordo com Roset et al. (2001), a maioria das florações contém cianobactérias produtoras de toxinas. Algumas espécies são capazes de produzir compostos metabólicos bioativos conhecidos como cianotoxinas e podem ser divididos de acordo com seu mecanismo de ação em: neurotóxicos, hepatotóxicos ou dermatotóxicos (Salomon et al., 1996).

As cianobactérias tóxicas mais comuns são *Microcystis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*, *Gloeotrichia* spp., *Anabaena* spp., *Lyngbya* spp., *Aphanizomenon* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Schizothrix* spp. e *Synechocystis* spp (WHO, 2003). A presença de cianobactérias na água não indica necessariamente um problema, quando em concentrações normais, porém a formação de florações e escumas e a presença de cianotoxinas na água podem ocasionar, como consequência principal, a morte de peixes, crustáceos, aves e outros animais domésticos (Salomon et al., 1996).

Intoxicações de humanos relacionadas ao contato com cianotoxinas já foram relatadas em vários países. No Brasil o caso mais recente foi em Caruaru (PE) em 1996 onde pacientes renais foram contaminados após uma sessão de hemodiálise. O incidente acabou com a morte de aproximadamente 60 pacientes (Carmichael et al., 1996; Azevedo, 1996)

Além da coexistência de bivalves e cianobactérias, estudos relacionados ao comportamento alimentar desses moluscos vêm mostrando que eles são capazes de se alimentar de cianobactérias. Baker (1998, 2000) e Dionísio Pires (2002) mostraram que *D. polymorpha* filtra *M. aeruginosa* tóxica e não tóxica, mesmo quando na presença de algas verdes. Em Dionísio Pires et al. (2004) a taxa de filtração de *D. polymorpha* foi maior com *M. aeruginosa* não tóxica que com a clorofita *Chlamydomonas* sp. Resultados similares foram encontrados também com *D. polymorpha* na presença de *Planktothrix* sp. uma espécie de cianobactéria filamentosa também produtora de toxina (Dionísio Pires et al., 2007). Outros bivalves de água doce também já mostraram capacidade para filtrar cianobactérias, como *Anodonta anatina* na presença de *Planktothrix* sp. (Bontes, 2007). Em geral, são poucos os estudos sobre taxa de filtração de bivalves em laboratório, sob condições controladas, na presença de cianobactérias (Dionísio Pires et al., 2005; Bontes et al., 2007).

Os estudos sobre taxa de filtração com *L. fortunei* são recentes, principalmente os que abordam a filtração do mexilhão dourado com cianobactérias. Von Ruckert (2004) foi a primeira a testar a taxa de filtração de *L. fortunei* na presença de cianobactérias. O trabalho utilizou como alimento *M. viridis* e *Pseudanabaena* sp. potencialmente tóxicas e *Selenastrum* sp., e mostrou que *L. fortunei* filtrou de forma indiferenciada os três tipos. Posteriormente, Gazulha (2011) avaliou a taxa de filtração e a sobrevivência de *L. fortunei* com *M. aeruginosa* tóxica e *Nitzschia palea* e confirmou a capacidade de

filtração do mexilhão à cianobactéria tóxica e a preferência na ingestão de *M. aeruginosa* ao invés de *Nitzschia* sp. Além disso, mostrou que *L. fortunei* é capaz de sobreviver durante 5 dias ingerindo apenas *M. aeruginosa* tóxica.

Burmester (2012) sugere que bivalves possuem adaptações fisiológicas que permitem que esses organismos sobrevivam em ambientes contaminados por cianotoxinas. Através da via glutathione-S-transferase (GST) são capazes de biotransformar a microcistina. A presença de enzimas antioxidantes como forma de proteção das células contra o estresse oxidativo provocado por cianotoxinas também já foi mencionada por outros autores (Prieto et al., 2007; Amado & Monserrat, 2010).

Assim como são poucos os estudos a respeito da taxa de filtração de *L. fortunei*, principalmente relacionados às cianobactérias, são poucos também os que relatam os efeitos das cianotoxinas nos bivalves em geral. Os estudos existentes são em sua maioria relacionados aos efeitos da microcistina, por ser a cianotoxina mais comum encontrada no ambiente, e possíveis alterações enzimáticas geradas. Como por exemplo, pode-se citar o trabalho de Sabatini et al. (2011) com o molusco *Diplodon chilensis patagonicus* que avaliou o estresse oxidativo causado por *M. aeruginosa* e a dinâmica da microcistina em *Mytilus galloprovincialis* por Vasconcelos et al. (1998) e Fernandes et al. (2009). Alguns gastrópodes também já foram estudados como *Lymnaea stagnalis* na presença de *Planktothrix agardhii* (Lance et al., 2006).

Até o presente momento nenhum estudo foi encontrado na literatura avaliando a relação da microcistina com a concentração de glicogênio e o depósito de cálcio em *L. fortunei*. O glicogênio é uma importante fonte primária de reserva energética para animais e bivalves em geral (de Zwann & Zandee, 1972; Barber & Blake, 1981; Haag et al., 1993). Fatores relacionados ao estresse do animal como alterações ambientais, variação

sazonal, jejum, poluição e competição já foram descritos como prováveis causas para alterações nos níveis de glicogênio (Zwann & Zandee, 1972; de Zwann & Wijsmann, 1976; Hummel et al., 1989). Petterson et al. (1997) mostraram que a presença de espécies exóticas também são responsáveis pela diminuição nas taxas de glicogênio em espécies de bivalves nativos. E em 1999 mostraram que essas mesmas espécies de bivalves nativos, quando em jejum, também apresentavam taxa de glicogênio inferior aos animais que ficaram pelo mesmo período de tempo sendo alimentados.

Da mesma forma que o glicogênio, o cálcio é essencial para os moluscos, pois participa da formação da concha, de processos metabólicos e da formação de células de defesa contribuindo para o equilíbrio do animal (homeostase) (Magalhães, 2011). Em situações de estresse como jejum, infecção e contato com moluscicidas, os moluscos são capazes de alterar suas vias metabólicas assim como a mobilização de carbonato de cálcio (Magalhães, 2011). Paschoal & Amato (1996) em um estudo com *Biomphalaria glabrata* infectados com *Schistosoma mansoni* observaram que durante a infecção os moluscos depositavam mais cálcio nas conchas e na glândula digestiva em resposta ao maior gasto energético nesse período. Já Mostafa (2007) relata que a mobilização de cálcio da concha para a parte mole de *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus* infectados por *S.mansoni* e *Schistosoma haematobium*, respectivamente, promove o processo de hipercalcificação.

Considerando que existem poucos estudos na área e ainda existem muitas dúvidas a respeito do comportamento e da biologia de *L. fortunei* e dos moluscos em geral, esse trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos a respeito da taxa de filtração de *L. fortunei* e seu comportamento alimentar diante de algas verdes e cianobactérias tóxicas além de avaliar, pela primeira vez na literatura, alterações na concentração de

glicogênio e de cálcio no mexilhão dourado quando exposto por um período de tempo longo a *M. aeruginosa* tóxica.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a taxa de filtração, a sobrevivência e possíveis alterações no metabolismo de *Limnoperna fortunei* na presença de algas verdes e cianobactérias.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a taxa de filtração de *L. fortunei* na presença de algas verdes de diferentes tamanhos e morfologia em experimentos de curta duração;

Avaliar a taxa de filtração de *L. fortunei* na presença de cianobactérias cepas tóxicas e não tóxicas, unicelulares e filamentosas em experimentos de curta duração;

Avaliar a sobrevivência e possíveis alterações no metabolismo de *L. fortunei* como na concentração de glicogênio e de cálcio quando em jejum e quando alimentados por *M. aeruginosa* cepa tóxica durante um período de tempo longo.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estrutura do laboratório

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica/ICB e no Laboratório de Estudos de *Limnoperna fortunei* (LELf).

O LELf está localizado no Centro de Pesquisas Hidráulicas da UFMG e foi construído, seguindo as normas de biossegurança (CTNBio), especialmente para desenvolver estudos com o mexilhão dourado. O laboratório possui uma sala molhada, onde estão os aquários para criação dos mexilhões, uma sala para criação de algas para alimentação de *L. fortunei*, um escritório e uma sala de entrada onde é realizada a troca das vestimentas para o acesso ao laboratório (Gandolf et al., 2009).

Todas as janelas são lacradas, as portas são de material isolante térmico e as bancadas, o chão e as paredes receberam uma pintura epóxi selante, facilitando a limpeza e a desinfecção. Todas as salas são climatizadas, sendo possível controlar temperatura e luz (Gandolf et al., 2009).

O sistema de abastecimento de água também foi desenvolvido para que não houvesse nenhum risco de contaminação dos efluentes do laboratório no sistema da COPASA, passando por um filtro de carvão ativado, cloro sólido e luz ultravioleta. E posteriormente para uma caixa de infiltração, não sendo nada eliminado na rede de tratamento da COPASA (Gandolf et al., 2009).

A manutenção, a manipulação e todos os experimentos utilizando o mexilhão dourado foram realizados no LELf, respeitando as normas de biossegurança exigidas para a manipulação de espécies exóticas evitando qualquer forma de dispersão desse animal.

O Laboratório de Ficologia localizado no Departamento de Botânica/ICB foi utilizado para cultivo inicial das cepas utilizadas como alimento nos experimentos e para as demais análises como leitura no espectrofotômetro e microscopia óptica. As cepas foram cultivadas em câmaras germinadoras, utilizadas exclusivamente para esse fim, a temperatura constante de 19°C e fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro. Após aproximadamente 3 semanas foram levadas para o LELf.

3.2 Coleta e manutenção dos animais

Os mexilhões foram coletados no lago da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional (Rio Paraná), nas proximidades do laboratório do Portinho, localizado no Refúgio Biológico Bela Vista, em Foz do Iguaçu/PR (25° 26' 48,9" S; 54° 32' 58,1" W). Ao chegarem ao LELf os animais foram mantidos em quatro aquários de vidro com 80 x 60 x 50 cm de tamanho, dispostos em linha e ligados a uma tubulação de drenagem comum. Nestes aquários os animais são mantidos em condições controladas, com um sistema de circulação interna que é capaz de simular o movimento da água no ambiente natural dos mexilhões e evitar o acúmulo de excretas ou das algas utilizadas na alimentação no fundo dos aquários (Gandolf et al., 2009). A limpeza dos aquários é realizada com frequência assim como a medição dos parâmetros de qualidade de água como oxigênio dissolvido (OD), pH, amônia, nitrito e temperatura. A temperatura da sala molhada é mantida a 19°C.

Os mexilhões foram alimentados de 1 a 2 vezes ao dia com uma mistura de algas verdes, incluindo *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Selenastrum* sp., cultivadas no próprio laboratório. Estas foram fornecidas pelo banco de culturas do Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica do ICB/UFMG.

Era respeitado um período de quarentena mínimo de 15 dias para utilização desses animais em experimento.

3.3 Desenvolvimento dos experimentos

Os tratamentos experimentais foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa a taxa de filtração de *L. fortunei* foi avaliada na presença de diferentes tipos de alimento, sendo escolhidas algumas cepas de clorofíceas (algas verdes) e algumas cepas de cianobactérias (tóxicas e não tóxicas). Na segunda etapa, foi realizado um experimento para verificar se uma alimentação baseada em cianobactérias tóxicas causaria algum efeito no metabolismo desses animais quando expostos por um período de tempo longo (24 dias).

Os primeiros itens, sobre o preparo dos animais e do alimento, foram comuns e similares nas duas etapas experimentais.

3.3.1 Seleção dos animais

Os mexilhões utilizados para os testes de taxa de filtração foram previamente retirados dos aquários de manutenção, medidos com paquímetro digital e selecionados dentro da faixa de tamanho escolhida 19 ± 1 mm. Essa faixa representa indivíduos jovens e está dentro da classe de tamanho utilizada por outros autores em experimentos de filtração tanto de *L. fortunei* quanto de *D. polymorpha* (Dionísio Pires et al., 2004; von Ruckert, 2004; Darrigran, 2006) Esses animais foram acondicionados em bandejas com água desclorada e mantidos em incubadoras (B.O.D), a 25°C, sem alimentação, com oxigenação constante e fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro, por 24 horas.

Após este período os animais foram retirados da incubadora, mantidos por cerca de 10 minutos em cima da bancada e os 30 animais mais ativos, que apresentavam concha aberta, sifão exposto, pé e/ou estavam fixados na bandeja (Fig. 1) foram selecionados. Para que os animais fossem mantidos em contato com o alimento de forma bem homogênea ao longo de todo o experimento, redes de náilon com abertura de 5 mm foram confeccionadas (Fig. 2). As redes, contendo 6 animais cada, foram colocadas em potes de vidro com água desclorada. Os animais foram mantidos por mais 24 horas na incubadora a 25°C, sem alimentação, com oxigenação constante e fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro.



Figura 1: Seleção dos animais mais ativos. Presença de sifão exposto (seta).



Figura 2: Animais selecionados acondicionados na rede de náilon.

3.3.2 Seleção das algas

As culturas de algas foram fornecidas pelo Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica/ICB e foram cultivadas em meio CHU10 (CHU, 1942) e mantidas em incubadora (B.O.D.) a 22° C e fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro no LELf. Foram escolhidas três algas clorofitas, que seriam utilizadas como controle (tabela 1): *Ankistrodesmus gracilis* (cepa 54) que é uma clorofita de comportamento colonial e formato da célula em foice; *Chlorella vulgaris* (cepa 56) uma clorofita arredondada unicelular, e *Chlamydomonas* sp. (cepa 21) uma clorofita arredondada e flagelada. Estas espécies já foram citadas pela literatura como fonte de alimento para mexilhões (Berg et al., 1996; Sylvester, 2005; Darrigran, 2006).

Para o tratamento, foram selecionadas quatro cepas de cianobactérias (tabela 1): *Microcystis aeruginosa* (cepa 19 e 26), organismo colonial com células esféricas retidas numa bainha gelatinosa, sendo a cepa 26 produtora de microcistina (hepatotoxina), e *Anabaena* sp. (cepa 24 e 100), um gênero filamentoso, com células arredondadas dispostas em fileiras, ambas as cepas potencialmente produtoras de saxitoxinas (neurotoxina).

Tabela 1: Algas selecionadas para experimento de taxa de filtração

Espécies de algas	Diâmetro µm	Biovolume mm³	Concentração cel.mL⁻¹	Filo
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	3	38.5	50x10 ³	Chlorophyta
<i>Chlamydomonas</i> sp.	10.9	857.8	20x10 ³	Chlorophyta
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.2	81.3	30x10 ³	Chlorophyta
<i>M. aeruginosa</i> (19)	4.2	44.6	50x10 ³	Cyanobacteria
<i>M. aeruginosa</i> (26)*	4.6	52.5	45x10 ³	Cyanobacteria
<i>Anabaena</i> sp. (100)**	8.4	333.3	20x10 ³	Cyanobacteria
<i>Anabaena</i> sp. (24)**	8.6	366.9	20x10 ³	Cyanobacteria

diâmetro: valores médios de no mínimo 20 indivíduos

* cepa tóxica produtora de microcistina.

** cepa tóxica potencialmente produtora de saxitoxina

3.3.3 Peso seco dos animais

Aproximadamente 50 animais da classe de tamanho 19 ± 1 mm foram pesados enquanto frescos com e sem concha e, depois, a parte mole permaneceu secando em estufa a 60°C por 48 horas (Vanderploeg, 2001; Gazulha, 2010). Depois foram pesados novamente e retornaram para a estufa por mais 24 horas. Foi realizada uma nova pesagem para garantir que o peso havia estabilizado. Com estas medidas, foi calculado o peso seco médio dos animais, que foi de 0.007 ± 0.002 g.

Estes valores podem ser utilizados para obter uma estimativa da taxa de filtração do mexilhão dourado por unidade de peso seco e permitir comparações com dados de literatura, até mesmo de indivíduos de outras espécies.

3.3.4 Taxa de Filtração

3.3.4.1 Desenho Experimental - Piloto

Após o período de aclimação de 48h em incubadora sem alimentação, os mexilhões receberam uma dose de alimentação correspondente a 2 mm³ de alimento por mL. Este valor foi estimado levando-se em consideração o biovolume das algas, previamente calculado para cada cepa de acordo com Rott (1981). Segundo Berg et al. (1996), alimentação em excesso poderia incentivar a produção de pseudofezes.

Foram utilizados 4 potes de vidro com 400 mL da mistura de alimento com água desclorada, com 6 mexilhões em cada pote, e 3 potes com a mesma quantidade da mistura de alimento mas sem mexilhões. Estes últimos foram usados para se estimar o crescimento das algas e cianobactérias, para posterior cálculo das taxas de filtração. Todos os recipientes foram mantidos em câmara incubadora sob as mesmas condições de temperatura (25°C) e aeração com pedra porosa constante. O experimento ocorreu por 24 horas e alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos 0, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h.

As amostras foram fixadas em lugol acético 1% e analisadas em microscópio óptico. A análise de quantificação do número de células foi feita em hemocítmetro do tipo Fuchs-Rosenthal, com um mínimo de 400 células contadas por amostra.

3.3.4.2 Desenho Experimental – Primeira modificação

Após análise dos resultados observou-se que as algas não estavam se mantendo em suspensão, o que levaria a um resultado falso positivo de taxa de filtração. Sendo assim, foram realizadas modificações na metodologia como o uso de duas mangueiras de

aeração inseridas em cada pote experimental e a redução do tempo de duração do experimento para 6 horas.

Além disso, um novo experimento foi realizado, onde o dobro da alimentação (1×10^5 cel.mL⁻¹) foi oferecida aos mexilhões com o objetivo de ver se a concentração de alimento alteraria a taxa com que eles filtram.

As amostras de algas foram coletadas e acondicionadas em geladeira a 4°C, e a densidade das culturas foi estimada a partir de análises em espectrofotômetro, no comprimento de onda a 750 nm. Desta forma, os resultados foram obtidos de forma mais rápida e eficiente.

Ao final dos experimentos (6h), com o auxílio de uma pipeta, foi realizada a coleta de fezes e pseudofezes. A coleta foi repetida novamente após 24 horas e 48 horas. A cada coleta os animais eram colocados em potes novos com água desclorada limpa, sem alimentação. Não foi possível a separação das pseudofezes das fezes, porém na análise microscópica apenas as células que se encontravam em perfeito estado foram contabilizadas.

3.3.4.3 Desenho Experimental – Segunda modificação

Nessa etapa os experimentos foram realizados com um shaker em substituição a aeração dupla, que voltou a ser simples e com pouca pressão, com o objetivo de evitar que o excesso de bolhas de ar pudesse causar uma interferência no processo de alimentação dos mexilhões (Fig. 3).

Os experimentos foram realizados fora da B.O.D, mas a temperatura da sala foi mantida constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e a temperatura da água monitorada com termômetro.

O tempo de duração também foi reduzido para 5 horas com amostras de 5 mL retiradas em intervalos de tempo 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h.

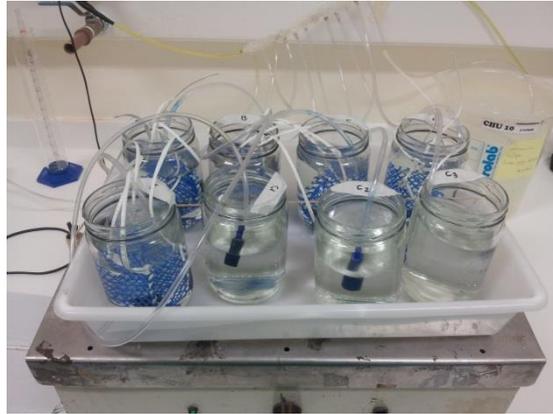


Figura 3: Experimento de taxa de filtração com shaker.

3.3.4.4 Desenho Experimental – Terceira modificação

Como o shaker não conseguiu manter uma velocidade de agitação constante foi substituído por agitadores magnéticos. Cada réplica foi colocada em um agitador magnético, com rotação aproximada de 800 rpm e uma aeração com pedra porosa bem fraca. Os demais procedimentos seguiram o que já foi descrito no item 3.3.4.3. Além disso, lâmpadas foram colocadas próximas aos vidros como forma de incentivar a abertura da concha dos mexilhões (Fig. 4).

Este desenho experimental foi finalmente adotado como padrão e os resultados apresentados foram baseados nos experimentos desenvolvidos com esta configuração.



Figura 4: Taxa de filtração utilizando agitador magnético.

3.3.4.5 Processamento das amostras e cálculos

Para se estimar a densidade das algas em cada pote, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda a 750 nm. Para cada espécie de alga utilizada, foram realizadas curvas de diluição, a partir da qual os dados de absorbância fornecidos pelo espectrofotômetro foram convertidos em cel/mL, através de uma regressão linear simples.

Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a taxa de filtração, baseando-se na equação de Coughlan (1969) (equação 1):

$$TF = V(\ln(C_o/C_t) - \ln(C'o/C't))/NT \quad (1)$$

onde TF é a taxa de filtração (mL/ind/h), V é o volume de água nos potes (mL), N é o número de mexilhões por potes, T é o tempo total do experimento (h), Co é a concentração de alimento (mm³/L) no tempo T = 0, Ct é a concentração de alimento no tempo T nos frascos com mexilhão, C'o é a concentração de alimento nos frascos controle no tempo T=0 e C't é a concentração de alimento no frasco controle no tempo T.

As fezes e pseudofezes foram analisadas em microscópio óptico e contadas em câmara de Sedgwick Rafter ou de Fuchs Rosenthal.

Com auxílio do programa JMP versão 7 a normalidade dos dados foi testada e em seguida foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das taxas de filtração obtidas, e Teste Tukey-Kramer para comparações à posteriori com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0.05$), com o objetivo de comparar os diversos tipos de alimento utilizados.

3.3.5 Experimento toxicidade crônica

3.3.5.1 Seleção das algas e cianobactérias

Para este experimento foram escolhidas as culturas de *Ankistrodesmus gracilis* como controle e de *Microcystis aeruginosa* (cepa 26) tóxica como tratamento (tabela 1). As concentrações da cianobactéria foram determinadas levando-se em consideração as densidades populacionais geralmente encontradas num ambiente eutrofizado (3×10^5 cel/mL⁻¹) com o objetivo de otimizar os efeitos da microcistina sobre os mexilhões. A toxicidade da *M. aeruginosa* (cepa 26) já havia sido determinada em estudos anteriores no Laboratório de Ficologia, sendo de 0,015 pg de microcistina.cel⁻¹.

3.3.5.2 Desenho experimental

Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo no total 9 caixas de plástico de tamanho 21,5 cm x 11,5 cm x 14 cm, com um volume de 1,5 L de água contendo o alimento escolhido, *Ankistrodesmus gracilis* (grupo controle) e *M. aeruginosa* (grupo tratado), e 25 animais em cada. Foram também mantidas três caixas com animais que

não receberam nenhum alimento (grupo jejum). Todas as caixas receberam duas mangueiras de aeração com pedra porosa, que foram dispostas nas extremidades, para aerar a água e manter o alimento em suspensão.



Figura 5: *Limnoperna fortunei* separados para o experimento de toxicidade crônica.



Figura 6: *Limnoperna fortunei* em B.O.D separados em grupos durante o experimento.

A duração do experimento foi de 24 dias, sendo que alguns animais foram periodicamente retirados com intervalos de uma semana, para serem analisados mais tarde. A determinação do período experimental total foi baseada em estudos semelhantes presentes na literatura (Patterson et al., 1997; Dionísio Pires et al., 2004; Lance et al., 2006; Sabatini et al., 2011). Os detalhes estão descritos a seguir.

1ª semana

Diariamente, foram realizadas medidas dos parâmetros de temperatura e oxigênio dissolvido (O.D.). Após a leitura os animais foram retirados da câmara incubadora, deixados por aproximadamente 10 minutos na bancada e então as condições dos animais (presença de sifão, pé, fixados ou não) foram analisadas. Os indivíduos mortos foram retirados.

A solução das caixas foi agitada e uma amostra de 100 mL foi retirada para análise de pH e nitrito. A solução foi então descartada, as caixas foram limpas com papel toalha para remover o máximo de alimento e rejeitos possível, sem encostar nos animais, e uma nova solução de alimento foi adicionada na concentração final de 3×10^5 cel/mL.

No 7º dia foram sacrificados animais de cada grupo, o corpo mole foi retirado das conchas e congelado em freezer. As conchas foram secas em estufa a 30°C por 48h. A quantidade de animais sacrificados em cada grupo variou, uma vez que o objetivo foi atingir pelo menos 1g de tecido mole fresco, para análises posteriores.

Amostras aleatórias da solução de alimentação foram coletadas no início e no final do dia e lidas em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 750 nm para análise da concentração de alimento disponível, e dessa forma assegurar que os animais estavam

se alimentando e estavam tendo alimento suficiente durante todo o período experimental.

2ª semana

A troca do alimento, a limpeza das caixas, a análise das condições físicas dos animais e a retirada dos indivíduos mortos, ocorreram diariamente. A leitura dos demais parâmetros passou a ser feita em dias alternados, uma vez que estas condições se mantiveram constantes. Amostras aleatórias do alimento também foram coletadas e analisadas como na primeira semana.

No 14º dia animais dos três grupos foram sacrificados até que se atingisse 1g de peso mole fresco, que foram congelados e as conchas secas, como descrito no item anterior.

3ª semana

Os procedimentos realizados foram os mesmos da segunda semana. Apenas a concentração do alimento foi reduzida para $1,6 \times 10^5$ cel/mL levando-se em consideração que o número de indivíduos em cada grupo também estava praticamente reduzido a metade, pela retirada de indivíduos nas semanas anteriores.

No 24º dia animais dos três grupos foram sacrificados até que se atingisse 1g de peso mole fresco, que foram congelados e as conchas secas.

3.3.5.3 Análise de cálcio nas conchas

As análises das conchas para determinação do cálcio, assim como as análises de glicogênio, foram realizadas no Departamento de Ciências Fisiológicas/Instituto de Biofísica/Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica/RJ. A determinação do conteúdo de cálcio nas conchas foi realizada segundo o método de volumetria de complexação modificada (Soido et al., 2009).

As conchas foram medidas com paquímetro digital, pesadas e depois secas em forno mufla a 450°C por 48 horas. Depois de frias as cinzas foram novamente pesadas e dissolvidas em 25 mL de ácido nítrico (HNO₃ P.A.). Dessa amostra mãe, foi aliquoteada 1 mL e diluída 100x em água destilada. Em um béquer 25 mL dessa amostra foi adicionada a 40 mL de água destilada, 10 mL de hidróxido de potássio (KOH) 30% e morexida. Foram colocados 50 mL de EDTA na bureta e realizada a titulação. O padrão foi feito com C₂CO₃ (carbonato de cálcio) a 0,01M.

3.3.5.4 Análise de glicogênio no tecido

Extraído de acordo com Pinheiro & Gomes (1994) e determinado pela técnica de 3,5 DNS (Sumner, 1925).

1ª etapa (digestão das amostras)

Os tecidos foram descongelados, pesados e triturados com ácido tricloroacético (TCA) 10% na proporção de 10 mL de TCA para 1g de tecido. Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm. O homogenado foi filtrado e aquecido por 5 minutos a 45°C para desfazer os complexos lipídicos. Dessa amostra filtrada foi retirada 1 mL e acrescentada a 2 mL de etanol absoluto gelado e em seguida foi colocada em banho de

gelo por 15 minutos. Por último, a amostra foi centrifugada a 18000g a 4°C e o pelet formado (glicogênio) ressuspendido em 5 mL de água destilada.

2ª etapa (hidrólise)

Em um tubo de ensaio de vidro foram adicionados 2 mL da amostra ressuspendida e 2 mL de ácido clorídrico (HCl) 1M e essa amostra permaneceu por 30 minutos em água fervendo. Após esse período foi acrescentado 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 3M, formando um hidrolisado alcalino.

3ª etapa (dosagem)

Nessa etapa foram misturados 1 mL do hidrolisado alcalino com 1 mL de 3,5 ácido dinitro salicilato (3,5 DNS). Essa amostra foi colocada em água fervendo por 5 minutos e depois foram acrescentados 13 mL de água destilada, formando um volume final de 15 mL. O padrão foi feito utilizando-se 50 µL de glicose, 950 µL de água destilada e 1 mL de 3,5 DNS.

A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda a 535 nm.

3.3.5.5 Análise dos resultados

Os resultados da análise de cálcio foram fornecidos em ppm Ca^{++} /g de cinza.

Os dados de absorvância fornecidos pelo espectrofotômetro referentes às amostras de glicogênio foram transformadas em mg glicose/grama de tecido através de uma regressão linear simples obtida com os valores dos padrões.

Com auxílio do programa JMP versão 7 a normalidade dos dados foi testada e intervalo de confiança estabelecido de 95% ($p \leq 0.05$). Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com os valores obtidos em cada tratamento, e Teste Tukey-Kramer para comparações à posteriori.

4.0 RESULTADOS

4.1. Teste de metodologia

4.1.1. Desenho experimental

Como o objetivo dos experimentos foi o de se testar a eficiência de filtração do *Limnoperna fortunei* com diversos tipos de alimento, uma premissa importante era que o alimento fosse mantido em suspensão para estar acessível aos animais durante todo o período experimental. Por isso os testes preliminares sobre o desenho experimental foram importantes.

Na primeira fase (Figura 7), utilizando apenas aeração simples em cada pote experimental, foi observado, por exemplo, que após 0.5 horas o alimento começou a sedimentar. Isso impediu uma avaliação correta da taxa de filtração, então modificações metodológicas foram feitas para eliminar o problema. A Figura 8 mostra os três tipos sucessivos de agitação que foram testados. A aeração dupla com pedra porosa assim como o shaker foram testados com a espécie de alga verde *Ankistrodesmus* sp. enquanto o agitador magnético foi testado com a alga verde flagelada *Chlamydomonas* sp. Os testes realizados na ausência de mexilhão dourado foram eficientes para manter as culturas de alga em suspensão durante todo o tempo experimental (Figura 8).

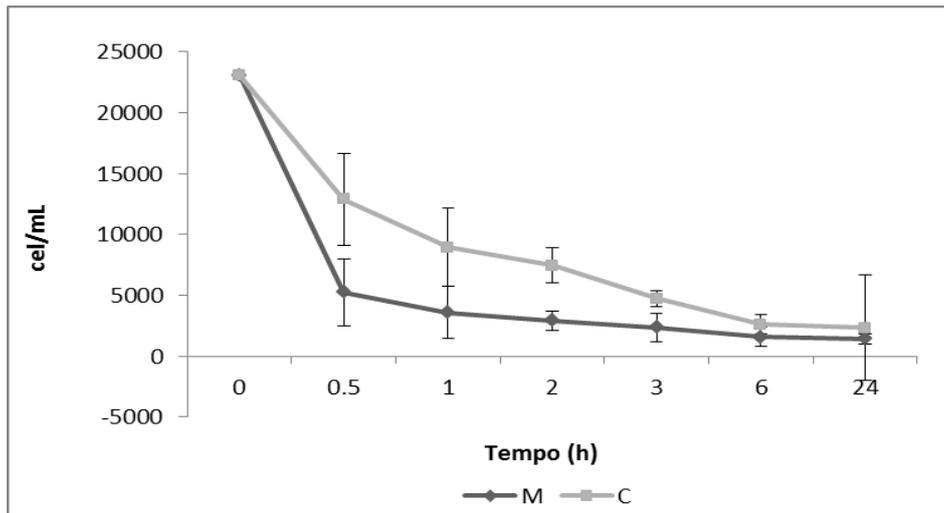


Figura 7: Teste de metodologia utilizando aeração simples com pedra porosa. Grupo com mexilhões (M) e grupo controle (C).

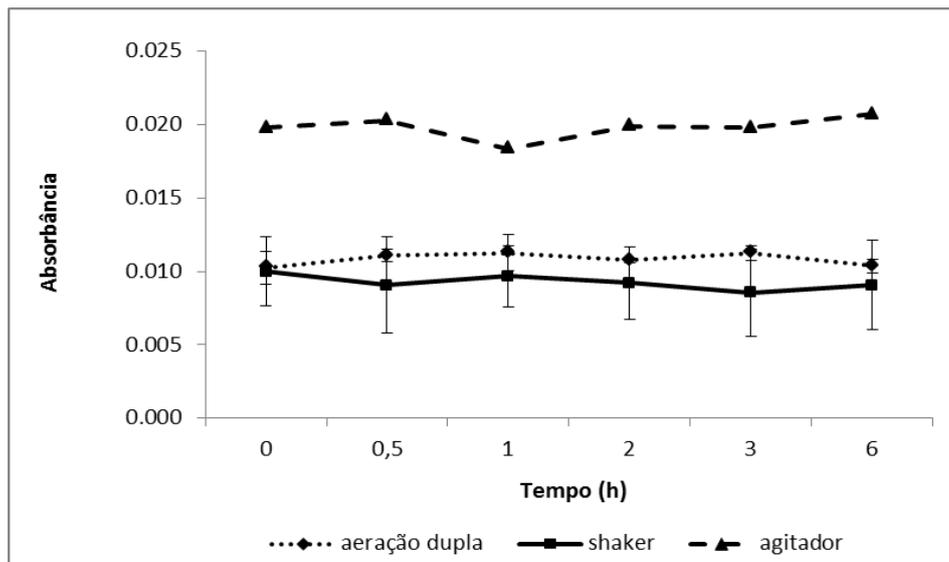


Figura 8: Teste de metodologia utilizando aeração dupla com pedra porosa, shaker e agitador magnético. Leitura de absorbância em espectrofotômetro 750 nm.

Posteriormente, os métodos de agitação foram testados na presença do mexilhão dourado. Embora os métodos usando aeração dupla com pedra porosa ou o shaker foram capazes de manter a cultura de algas em suspensão, afetaram o comportamento dos mexilhões, pois observou-se que eles permaneciam fechados a maior parte do tempo, portanto não permitindo uma alimentação efetiva (Figura 9a e b). Ao contrário, o agitador magnético foi eficiente ao manter tanto a cultura em suspensão quanto ao permitir que os animais se mantivessem abertos e filtrando. A maior eficiência de filtração com este método pode ser vista na Figura 9c.

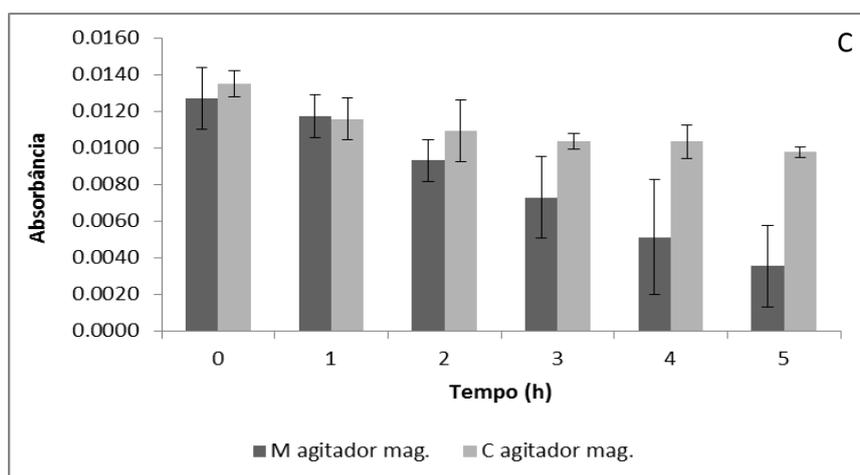
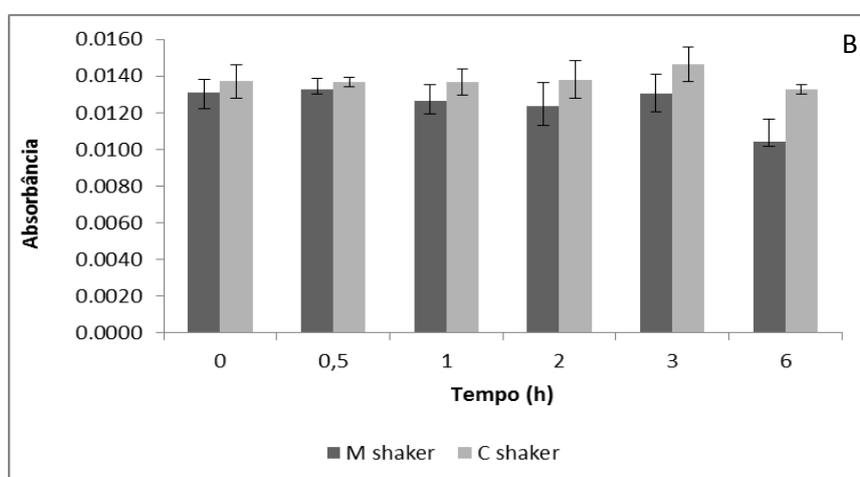
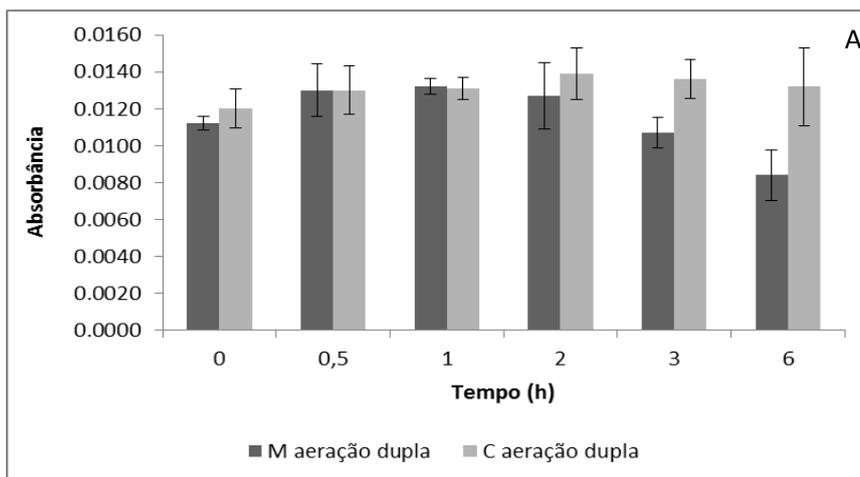


Figura 9: Teste de metodologia na presença do mexilhão. A – aeração dupla; B – shaker; C – agitador magnético. Grupo com mexilhão (M) e grupo controle (C). Leitura de absorbância em espectrofotômetro 750 nm.

4.1.2 Concentração do alimento

Os testes para avaliar se a concentração de alimento influenciaria a taxa de filtração do mexilhão dourado, mostraram que a concentração do alimento oferecido não alterou o comportamento alimentar de *L. fortunei*, pois as curvas mantiveram o mesmo padrão de diminuição da concentração de alimento com o tempo (Figuras 10 e 11).

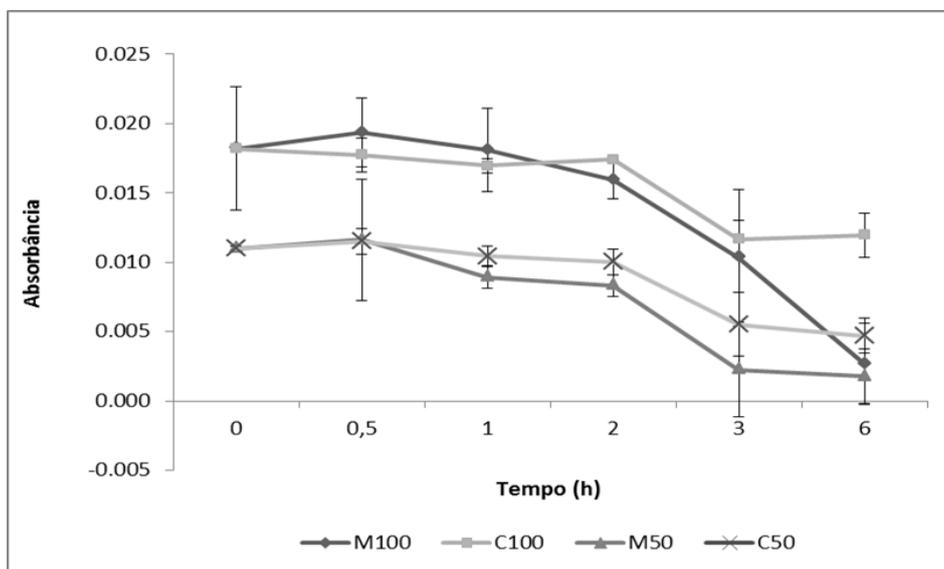


Figura 10: Determinação da concentração de alimento utilizando *Ankistrodesmus gracilis* e aeração simples com pedra porosa. Grupo com mexilhões nas concentrações 5×10^4 (M50) e 1×10^5 (M100). Grupo controle nas concentrações 5×10^4 (C50) e 1×10^5 (C100). Leitura de absorvância em espectrofotômetro 750 nm.

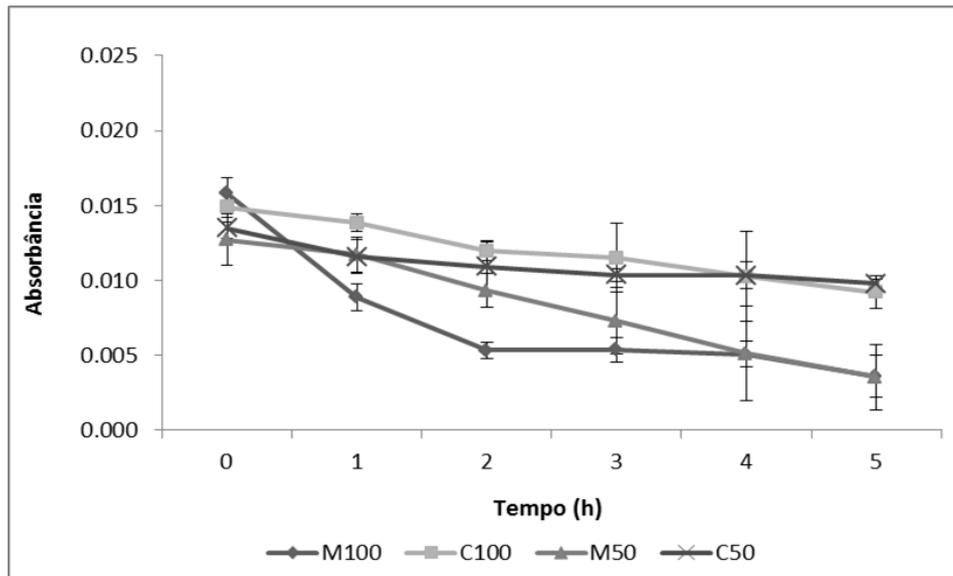


Figura 11: Determinação da concentração de alimento utilizando *Ankistrodesmus gracilis* e agitador magnético. Grupo com mexilhões nas concentrações 5×10^4 (M50) e 1×10^5 (M100). Grupo controle nas concentrações 5×10^4 (C50) e 1×10^5 (C100). Leitura de absorbância em espectrofotômetro 750 nm.

4.2 Determinação do peso seco

Considerando que o mexilhão dourado é um animal de porte pequeno, que a maior parte de seu corpo é composta de água e 80% do seu peso é devido à concha, o peso seco foi calculado para fornecer uma estimativa mais real da taxa de filtração do animal em relação ao seu peso (Tab. 2). A medida de peso seco permite uma padronização melhor da taxa de filtração do que quando o cálculo é feito com relação a um indivíduo. Os dados podem, por exemplo, serem comparados com outros organismos de espécies diferentes.

Tabela 2: Peso seco (g) de *Limnoperna fortunei* referente à classe de tamanho (mm) usada neste trabalho.

Tamanho mm	Peso seco		
	P1 (c/concha) g	P2 (fresco s/concha) g	P3 (48h seco) g
18.900 ± 0.531	0.513 ± 0.109	0.085 ± 0.019	0.007 ± 0.002

4.3 Taxa de filtração

A taxa de filtração foi medida e calculada para cada espécie de alga separadamente. A figura 12 mostra a taxa de filtração de *L. fortunei* na presença de três espécies de algas verdes em diferentes intervalos de tempo. O tempo 1 corresponde a 60 minutos, o tempo 3 a 180 minutos, e o tempo 4 representa 240 minutos. Com relação ao tempo, as taxas de filtração calculadas para *Chlamydomonas* sp. não mostraram muita alteração, com pequeno aumento nos tempos 3 e 4. Quando *Ankistrodesmus* sp. foi usado como alimento, a taxa de filtração aumentou com o aumento do intervalo de tempo. Finalmente com *Chlorella* sp., a taxa de filtração foi ligeiramente maior no tempo 1 diminuindo com o tempo. Quando os tipos de alimento (algas) são comparados entre si nota-se que houve preferência significativa do mexilhão dourado por *Chlamydomonas* sp. em relação às demais espécies, em cada um dos intervalos de tempo testados, com taxa de filtração média de 17.26 ± 6.62 mL/ind/h.

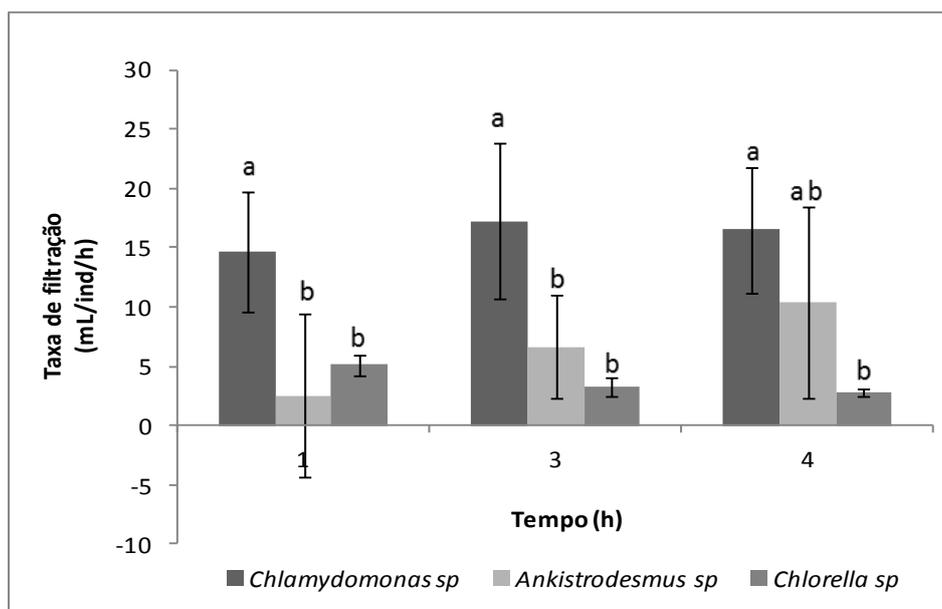


Figura 12: Taxa de filtração de *Limnoperna fortunei* na presença de três espécies de algas verdes. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes.

Os experimentos realizados com cianobactérias tóxicas e não tóxicas mostraram que *L. fortunei* foi capaz de filtrar de forma eficiente às duas cepas de *Microcystis aeruginosa*, não mostrando diferenças significativas entre a cepa 26, tóxica, e a cepa 19, não tóxica, apresentando valores médios de 16.62 ± 4.12 mL/ind/h e 19.67 ± 2.14 mL/ind/h, respectivamente, às 3h. Não houve também diferença significativa na taxa de filtração em relação ao tempo em que o mexilhão ficou exposto ao alimento (Fig.13).

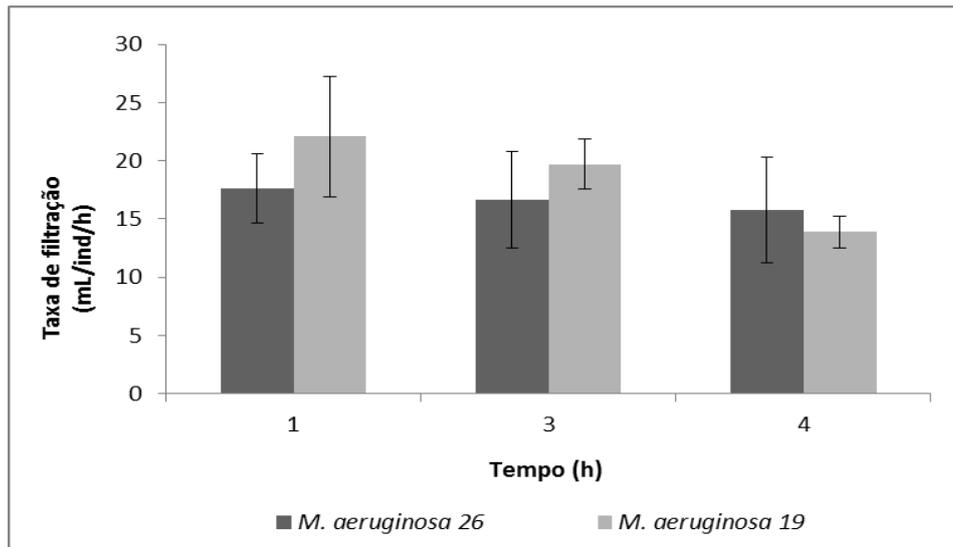


Figura 13: Taxa de filtração de *Limnoperna fortunei* na presença de *Microcystis aeruginosa* tóxica (26) e não tóxica (19) em diferentes intervalos de tempo.

Ao contrário da cianobactéria *Microcystis*, *L. fortunei* apresentou taxas de filtração significativamente diferentes quando alimentado com as duas cepas de *Anabaena* sp. As taxas de filtração foram maiores para a cepa 100 em relação a cepa 24. Porém os valores médios de ambas as cepas não foram muito elevados, apresentando valores máximos de 12.15 ± 4.78 mL/ind/h, no tempo 1, para cepa 100 e 1.71 ± 1.77 mL/ind/h, no tempo 3, para cepa 24 (figura 14).

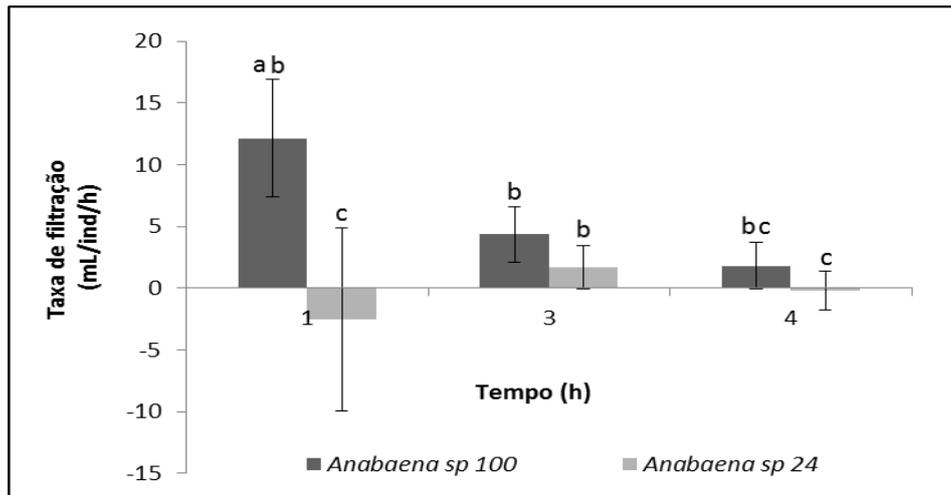


Figura 14: Taxa de filtração de *Limnoperna fortunei* na presença de *Anabaena* sp. cepa 100 e cepa 24, em três intervalos de tempo. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes.

Através dos dados apresentados nas figuras 12, 13 e 14 observa-se que nestes experimentos de taxa de filtração os valores referentes a 1ª hora apresentaram variações maiores entre os grupos, e isso diminuiu a partir da 3ª hora e 4ª hora. É possível, portanto, que na 1ª hora os animais estivessem ainda em fase de adaptação à condição experimental.

Levando-se em consideração que a partir da 3ª hora a taxa de filtração ficou mais estável, a comparação entre as taxas de filtração para os diversos tipos de alimento foi feita a partir deste período. Pode se observar que os maiores valores de taxas de filtração apresentados são para as cepas de *M. aeruginosa*, não havendo diferenciação entre as duas, e para a *Chlamydomonas* sp. As duas cepas de *Anabaena* sp., assim como *Chlorella* sp., apresentaram as taxas de filtração mais baixas ao longo de todo período experimental. *Ankistrodesmus* sp. variou seus valores, aumentando gradativamente durante o experimento.

4.3.1 Pseudofezes

No fim do período experimental para os experimentos de taxa de filtração, foram coletadas as fezes e pseudofezes dos recipientes, como descrito na metodologia. Os valores obtidos para pseudofezes para os diversos tipos de alimento estão representados na figura 15. Pode se observar que os valores não foram muito elevados, e a espécie que teve a menor taxa de filtração, *Chlorella* sp., foi a que apresentou também o menor valor de pseudofezes.

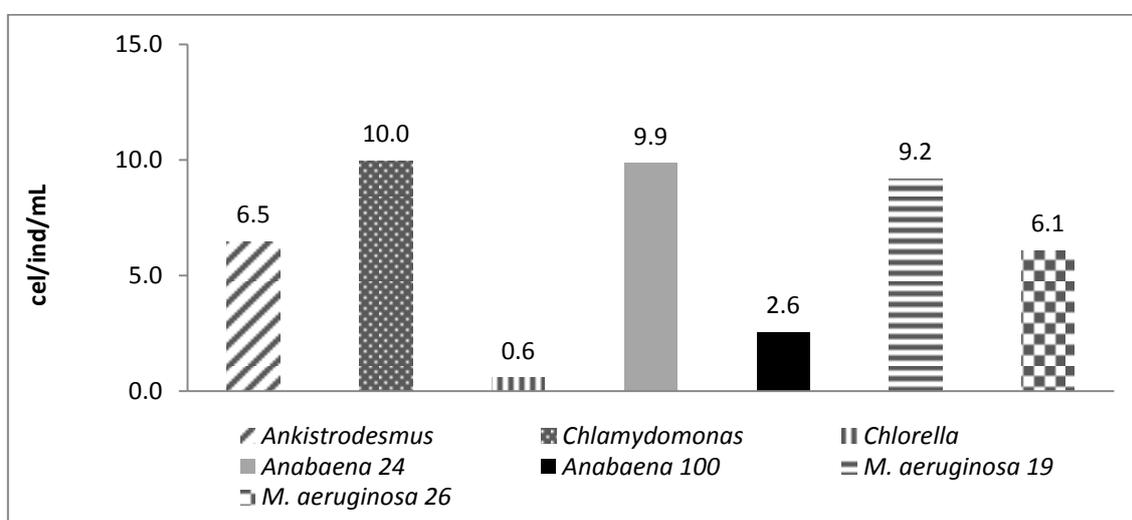


Figura 15: Média da produção de pseudofezes por indivíduo com relação aos diversos tipos de alimento usados nos experimentos de taxa de filtração.

4.4 Experimento de toxicidade crônica

4.4.1 Análise de parâmetros ambientais

Alguns parâmetros de qualidade da água foram monitorados ao longo dos 24 dias experimentais, para garantir que os animais estivessem em boas condições e que não sofressem interferências de fatores externos, garantindo assim que os resultados obtidos fossem uma resposta apenas ao tratamento realizado. Os resultados estão representados

na tabela 3. A tabela mostra que os valores foram muito similares entre os três tratamentos experimentais. Os valores também mostram que a qualidade de água se manteve boa, por exemplo, com valores altos de oxigênio dissolvido (OD) e baixos de nitrito, mantendo, portanto, as condições ideais para a realização do experimento.

A taxa de mortalidade foi baixa, com 2 animais mortos no grupo jejum e 1 animal no grupo controle, ambos na primeira semana.

Tabela 3: Parâmetros de qualidade da água analisados durante os 24 dias de experimento (valores médios \pm desvio padrão) nos três tratamentos. Os valores foram agrupados em dois intervalos de tempo.

	1º ao 14º dia			15º ao 24º dia		
	Jejum	<i>A. gracilis</i>	<i>M. aeruginosa</i>	Jejum	<i>A. gracilis</i>	<i>M. aeruginosa</i>
pH	8.02 \pm 0.19	8.07 \pm 0.19	8.02 \pm 0.23	7.99 \pm 0.14	8.00 \pm 0.15	7.96 \pm 0.13
Temp (°C)	18.62 \pm 0.29	18.58 \pm 0.26	19.64 \pm 0.29	19.04 \pm 0.21	18.67 \pm 0.20	19.39 \pm 0.26
Nitrito (mg/L)	0.18 \pm 0.09	0.18 \pm 0.09	0.22 \pm 0.10	0.19 \pm 0.12	0.22 \pm 0.16	0.29 \pm 0.19
OD (mg/L)	8.25 \pm 0.10	8.27 \pm 0.08	8.07 \pm 0.08	8.17 \pm 0.07	8.25 \pm 0.04	8.12 \pm 0.07
OD (%)	88.32 \pm 0.80	88.37 \pm 0.64	88.12 \pm 0.54	88.04 \pm 0.69	88.36 \pm 0.30	88.16 \pm 0.35

4.4.2 Determinação da concentração de cálcio nas conchas

O resultado das análises de cálcio das conchas dos animais experimentais, representado na figura 16, mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados (*M. aeruginosa* 26, e jejum) e controle (*Ankistrodesmus* sp.), assim como entre os intervalos de tempo do experimento (7 dias, 14 dias, 24 dias) ($p = 0,2699$). Não foi observada nenhuma diferença mesmo comparando o resultado obtido para os animais experimentais com o valor obtido pelo grupo externo, considerado controle externo um

grupo de animais que cresciam em condições de cultivo normais e padrão do laboratório. Os valores médios variaram entre 429.5 ppm Ca^{++} /g cinza e 335.53 ppm Ca^{++} /g cinza.

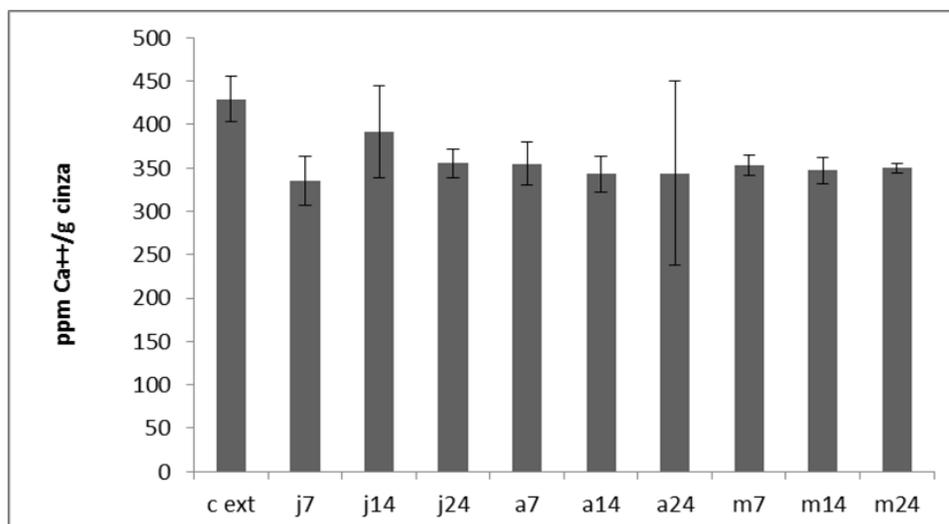


Figura 16: Quantificação de cálcio nas conchas de moluscos nos grupos tratado e controle após o 7^o, 14^o, e 24^o dias, respectivamente. Controle externo (c ext), grupo jejum (j), grupo *Ankistrodesmus* sp. (a) grupo *M. aeruginosa* (m).

4.4.3 Glicogênio

A figura 17 representa os resultados obtidos para as análises de glicogênio nos tecidos dos moluscos, nos três tratamentos experimentais e nos três intervalos de tempo. As análises de glicogênio no grupo que permaneceu em jejum, assim como no grupo controle alimentado com *Ankistrodesmus* sp., não apresentaram diferenças significativas durante as 2 primeiras semanas experimentais, enquanto que no grupo alimentado com *M. aeruginosa* 26 houve diferença significativa já a partir da primeira semana.

Observando-se o resultado dos diversos tratamentos, conclui-se que não houve diferença no conteúdo de glicogênio no grupo em jejum comparado com o grupo

controle nos primeiros 14 dias experimentais. O grupo tratado da *M. aeruginosa*, por outro lado, apresentou conteúdo de glicogênio diferente e mais elevado do que o grupo jejum e o controle no período entre a 1ª e a 2ª semana, e na 3ª semana os valores se assemelharam ao do grupo controle alimentado com *Ankistrodesmus* sp.

Levando-se em consideração o controle externo, o grupo em jejum sempre apresentou valores mais baixos de glicogênio. No 24º dia, o conteúdo de glicogênio dos grupos alimentados com *Ankistrodesmus* e *Microcystis* ficou próximo ao grupo controle externo. O grupo tratado com *Microcystis*, já apresentou valores elevados no 14º dia, sendo estatisticamente diferente dos demais. Com relação aos valores baixos encontrados no 7º dia para os três tratamentos, é possível que os animais tenham ficado estressados com a manipulação e a aclimatação antes do experimento e precisaram de um tempo maior para se acostumar com as condições experimentais antes de começar a acumular glicogênio com valores similares ao grupo externo.

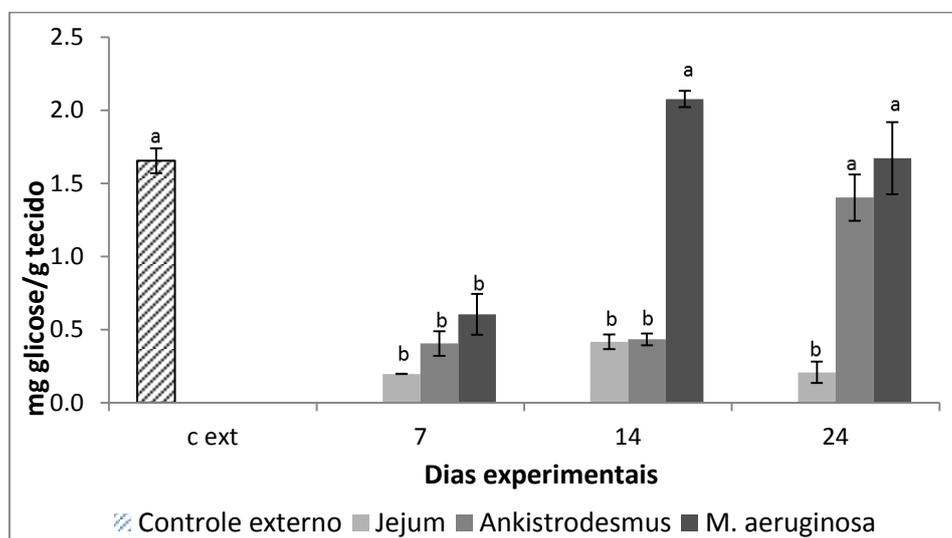


Figura 17: Quantificação de glicogênio nos grupos tratado e controle após o 7º, 14º, e 24º dias, respectivamente ($p = 0,0005$). Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes.

5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5.1 Taxa de filtração

A taxa de filtração de bivalves é um dos principais mecanismos de estudo quando se deseja entender melhor os hábitos de vida e o funcionamento do metabolismo desses animais filtradores. Ensaios laboratoriais nessa área têm sido realizados com frequência uma vez que, as condições experimentais podem ser controladas como desejado, o que não ocorre nos estudos em campo. Apesar disso, diferenças no desenho experimental têm sido uma das principais causas de variações nos valores de taxa de filtração reportados na literatura para espécies de bivalves invasores (Reeders et al.,1989; Jørgensen, 1990; Reeders and Bij de Vaate, 1990).

No presente trabalho foram realizados diversos testes no intuito de obter o melhor desenho experimental possível, dentro das condições que o LELf (Laboratório de Estudos de *Limnoperna fortunei*) fornecia, de forma a otimizar a taxa de filtração de *L. fortunei*. De acordo com os dados apresentados na figura 7, conclui-se que o mecanismo de aeração simples utilizando uma pedra porosa não foi capaz de manter em suspensão as algas, oferecidas como alimento para os mexilhões, durante o tempo experimental desejado. A figura mostra que com meia hora já ocorre uma queda acentuada na concentração de alimento no grupo controle. Esse resultado levaria a uma conclusão falso-positiva de que os mexilhões estariam filtrando uma quantidade maior de alimento do que o real, uma vez que o alimento sedimentado seria considerado como filtrado. Por outro lado, a aeração dupla com pedra porosa gerava muita bolha de ar na água, o que possivelmente pode ter causado um incomodo ao mexilhão, porque muitos indivíduos permaneceram com a concha fechada durante os testes realizados. Da mesma forma, o shaker, que para ser capaz de manter as algas em suspensão, precisou de um movimento

de rotação maior, afetando os mexilhões que permaneceram a maior parte do tempo fechados. Em ambos os casos (aeração dupla e shaker) a atividade de filtração dos animais foi comprometida e conseqüentemente a estimativa dos valores de taxa de filtração. Dos métodos testados, o agitador magnético foi o melhor, capaz de manter as algas em suspensão e os mexilhões com a valva aberta possibilitando que a taxa de filtração fosse estimada de maneira confiável. Embora com um desenho experimental diferente, Dionísio Pires (2004) e Sylvester et al. (2005) já haviam usado o agitador magnético em experimentos de taxa de filtração e obtiveram resultados positivos com *D. polymorpha* e *L. fortunei* respectivamente.

Segundo alguns autores, fatores como temperatura, concentração de alimento, tamanho e biomassa corporal podem influenciar a taxa de filtração de bivalves. Sylvester (2005) e Pestana (2009) mostraram que *L. fortunei* atinge taxas de filtração ótimas com a temperatura da água a 25°C, a mesma escolhida para os experimentos realizados neste trabalho. Em relação à biomassa corporal, indivíduos jovens menores filtram mais que indivíduos maiores, porque possuem metabolismo mais acelerado e a área de superfície das brânquias, em relação à área corporal, também é maior quando comparada a de indivíduos maiores (Kryger & Riisgard, 1988; Reeders & Bij de Vaate, 1990; Segad et al., 2003). A classe de tamanho 19 ± 1 mm, utilizada neste estudo, corresponde a indivíduos considerados jovens.

A concentração de alimento foi um dos fatores avaliados neste trabalho. Embora Higgins (1980) e Horgan & Mills (1997) afirmem que a taxa de filtração é maior quanto maior a disponibilidade de alimento, nos testes realizados com *Ankistrodesmus* sp. nas concentrações de 5×10^4 e 1×10^5 cel.mL⁻¹ (sendo a segunda concentração o dobro da primeira) ambos os resultados mostraram que a concentração do alimento não alterou o comportamento alimentar de *L. fortunei*, pois as curvas mantiveram o mesmo padrão de

diminuição da concentração de alimento com o tempo (Figuras 3 e 4). De acordo com Sprung & Rose (1988), *D. polymorpha*, assim como outros bivalves filtradores (Davids, 1964; Schulte, 1975; Widdows et al., 1979), atinge sua taxa de filtração máxima em baixas concentrações de alimento. A alimentação em excesso é um fator negativo para a estimativa da taxa de filtração, já que pode acabar estimulando a produção de pseudofezes (Kiørboe & Møhlenberg, 1981; Sprung & Rose, 1988), sendo assim, apesar de ambas as concentrações de alimento estarem dentro da faixa considerada ideal pela literatura até 10^5 partículas.mL⁻¹ (Owen, 1974) e 2 mm³.L⁻¹ (Sprung & Rose, 1988), optou-se por trabalhar com a concentração de alimento mais baixa.

As taxas de filtração de *L. fortunei* obtidas neste trabalho variaram muito, o que se pode observar pelo desvio padrão alto. Essas variações podem ocorrer pela diferença na capacidade de filtração de cada animal individual e mesmo devido às peculiaridades de cada espécie de alga fornecida como alimento. Essas diferenças inter-indivíduo já foram citadas por outros autores (von Ruckert et al., 2004; Sylvester et al., 2005). O tempo experimental em que o animal fica exposto ao alimento, também é um fator que deve ser considerado. Apesar de alguns trabalhos nessa área considerarem a taxa de filtração atingida no período de 1 hora, deve-se ressaltar que o mexilhão dourado é um animal muito sensível e exige um tempo de aclimação sempre que é tocado, ou que muda de ambiente ou mesmo de temperatura. Dessa forma o período de 1 hora é um período crítico, em que dependendo da forma como o animal foi manipulado e do grau de estresse em que ele se encontra, ele poderia estar com seu metabolismo alterado e até mesmo permanecer fechado por várias horas.

A partir de observações do comportamento dos mexilhões como concha aberta, presença de sifão e muitas vezes do pé ao longo dos experimentos realizados, optou-se por comparar as taxas de filtração obtidas dos diversos alimentos testados a partir de 3

horas de intervalo, a fim de assegurar que os animais já estariam aclimatados e nem sempre considerando o maior valor obtido.

Na presença das clorofitas a taxa de filtração do mexilhão foi maior com a espécie de *Chlamydomonas* sp., (14.65 ± 5.09 a 17.26 ± 6.62 mL/ind/h). Apesar dessa espécie possuir uma parede celular característica muito rígida, o que a torna mais difícil de digerir (Roberts et al., 1985; Van Donk et al., 1997), é a única das três espécies de clorofitas que apresenta flagelo e capacidade natatória. Sendo assim a *Chlamydomonas* sp. pode ter permanecido em suspensão um tempo maior do que as demais espécies, facilitando sua captura pelo mexilhão que é um filtrador sésil. Sprung & Rose (1988) já haviam mencionado *Chlamydomonas* sp. como ótimo alimento para *D. polymorpha*, sendo retida com eficiência e estimulando a produção de pseudofezes apenas quando em excesso. Apesar de *Chlorella* sp. ter sido utilizada com sucesso em experimentos de filtração com *L. fortunei* por outros autores (Sylvester et al., 2005), apresentou valores de taxa de filtração baixos (5.11 ± 0.91 a 2.77 ± 0.29 mL/ind/h) neste trabalho.

Algas verdes de gêneros morfológicamente similares a *Ankistrodesmus* sp. já foram usadas em experimentos com o mexilhão dourado, como por exemplo *Selenastrum* sp. (von Ruckert et al., 2004) e *Monoraphidium* sp. (Gazulha, 2010). *Ankistrodesmus* sp. é utilizada como alimento padrão na manutenção das culturas estoques do mexilhão no LELf. No presente estudo, apresentou valores de taxa de filtração baixos que variaram ao longo do período experimental, com um erro padrão alto, praticamente em todas as amostragens. Isso sugere que além de uma possível pré-adaptação, assim como ocorreu com von Ruckert (2004) em seu experimento com *Selenastrum*, esses baixos valores de taxa de filtração podem ser consequência de uma pré-adaptação dos animais a esse alimento, que já era utilizado na manutenção do cultivo desses mexilhões. O mesmo pode ter ocorrido com *Chlorella* sp. A cepa de *Ankistrodesmus* sp. apresenta células

individuais e pode formar pequenas colônias de alguns indivíduos retidos numa matriz gelatinosa. É possível que, apesar de gêneros semelhantes serem citados como bom alimento para moluscos bivalves, suas características morfológicas podem de certa forma ter dificultado a captação e filtração por parte de *L. fortunei*. Foi também a menor espécie fornecida como alimento neste trabalho, com diâmetro de 3 μm e biovolume 38.5 mm^3 . Embora a seleção de alimento por bivalves seja conhecida e relatada em vários estudos, os critérios pelos quais essa seleção de partículas ocorre ainda não estão bem esclarecidos (Baker et al., 2000).

Trabalhos anteriores já reportaram a taxa de filtração de *L. fortunei*, assim como de *D. polymorpha* com *Microcystis*, sendo ela tóxica ou não. Porém esse trabalho apresenta um desenho experimental diferente dos anteriores, com animais suspensos em redes de nylon, aeração de pedra porosa e agitação magnética para suspensão das algas em conjunto, além do estímulo luminoso para manter os animais com a concha aberta.

A cepa *Microcystis* 26 produz microcistina-LR, uma endotoxina hepatotóxica, a uma concentração de 0,015 pg de microcistina.cel⁻¹. Esta toxina é liberada no ambiente apenas após lise celular. Ambas as cepas de *M. aeruginosa* foram filtradas com eficiência por *L. fortunei*, não apresentando diferenças significativas entre elas. O mexilhão não foi capaz de realizar uma filtração seletiva e diferenciar a cepa tóxica da não tóxica, nem mesmo ao longo de todo o período experimental. A cepa 26 apresentou valores médios de 17.63 \pm 2.97 a 15.73 \pm 4.55 mL/ind/h, enquanto a cepa 19 foi filtrada a uma taxa média de 22.07 \pm 5.20 a 13.87 \pm 1.36 mL/ind/h. Quando comparada com as espécies de clorofitas, foi filtrada tão bem quanto a *Chlamydomonas* sp. Uma hipótese pode estar relacionada à presença de vacúolos no interior das células, o que permite sua flutuação ao longo da coluna d'água e assim como a *Chlamydomonas* sp., ficam em

suspensão por um período maior facilitando sua captação pelo mexilhão que permanecia fixado.

Estudos anteriores mostraram que *D. polymorpha* é capaz de filtrar de forma mais eficiente *M. aeruginosa* do que células coloniais e diatomáceas (Bastviken et al., 1998) e é capaz de selecionar positivamente a cianobactéria com relação à clorofita *Scenedesmus*, quando em uma mistura, de acordo com Baker et al. (2000). Dionísio Pires & Van Donk (2002) também mostraram a seleção positiva de *D. polymorpha* por *M. aeruginosa*, quando o molusco era colocado para filtrar numa mistura de *M. aeruginosa* e *Chlamydomonas*. Dionísio Pires et al., (2004) também obtiveram o mesmo resultado com *D. polymorpha* na presença de uma mistura de *M. aeruginosa* e *Scenedesmus*. Além disso, estes mesmos autores verificaram a preferência de *D. polymorpha* por cianobactérias pequenas ao invés de detritos e outros fitoplâncton em geral, e também não encontraram nenhuma diferenciação na taxa de filtração do mexilhão zebra em cepas tóxicas e não tóxicas de *Microcystis*.

Apesar de terem sido as mais filtradas, a produção de pseudofezes foi mais alta em *Chlamydomonas* sp. e *M. aeruginosa* 26 com 10.0 e 9.2 cel/ind/mL respectivamente, quando comparadas com as demais algas. *Ankistrodesmus* sp. apresentou valor médio de 6.45 cel/ind/mL, porém sua taxa de filtração foi bem mais baixa (2.51 ± 6.85 a 10.41 ± 8.11 mL/ind/h) sugerindo que esta espécie foi pouco ingerida por *L. fortunei*, enquanto *Chlorella* sp., que também não teve uma taxa de filtração alta, foi pouco expelida nas pseudofezes com valores médios de 0.57 cel/ind/mL.

Anabaena sp. assim como *M. aeruginosa* é uma das espécies de cianobactérias mais abundantes na natureza e está associada à formação de florações em ambientes aquáticos. Suas células também possuem vesículas de gás que permitem flutuar na

coluna d'água, porém são filamentosas e seu biovolume é bem maior quando comparada a *M. aeruginosa* (366.9 mm³ (cepa 24) e 44.6 mm³ (cepa 19) respectivamente). Cepas do gênero *Anabaena* podem produzir toxinas hepatotóxicas, como microcistina, e também toxinas neurotóxicas como saxitoxinas (Chorus & Bartam, 1999). As cepas utilizadas neste estudo não produziram microcistina, mas ambas são capazes de produzir saxitoxinas (dados não publicados).

O mexilhão dourado não foi capaz de filtrar com eficiência *Anabaena* sp. da mesma forma que *M. aeruginosa*, talvez devido ao formato de filamento de suas colônias. Apesar de *L. fortunei* não ter apresentado taxas de filtração elevadas para ambas as cepas de *Anabaena* sp., na primeira hora do experimento houve diferença significativa nos valores de taxa de filtração, sendo que de acordo com a figura 14, *L. fortunei* demonstrou preferência pela cepa 100 (12.15 ± 4.78 ceL/ind/mL) e os valores negativos representam rejeição ou seleção negativa, pela cepa 19 (-2.5 ± 7.38 ceL/ind/mL). Com o decorrer do experimento essa diferença nos valores de taxa de filtração entre as duas cepas diminuiu, não sendo mais significativa, porém a cepa 100 continuou sendo a mais filtrada.

Gazulha et al. (2012) mostraram a preferência de *L. fortunei* por espécies unicelulares ao invés de filamentosas, quando avaliou a taxa de filtração do mexilhão na presença de *M. aeruginosa* e *Planktothrix* sp. e concluiu que apesar de filtrarem da mesma forma as duas espécies o mexilhão expele mais *Planktothrix* nas pseudofezes. Da mesma forma Bontes et al. (2007) estudando o bivalve filtrador *Anodonta anatina* na presença de colônias de *M. aeruginosa* e filamentos de *Planktothrix* sp. observaram que apesar de filtrar as duas espécies, *A. anatina* expele mais *Planktothrix* nas pseudofezes. Esses estudos sugeriram que bivalves filtradores são capazes de filtrar tanto espécies unicelulares, quanto coloniais e filamentosas, porém realizam uma seleção do alimento

na cavidade do manto e nos palpos ingerindo preferencialmente aqueles de menor tamanho.

As cepas de *Anabaena* sp. usadas neste trabalho foram selecionadas no banco de culturas do Laboratório de Ficologia pois dados prévios apontavam a cepa 100 como produtora da cianotoxina microcistina e a cepa 24 como não produtora. Porém, análises feitas recentemente por cromatografia líquida (dados não apresentados), não confirmaram a existência desta toxina na cepa 100. Sabe-se que, espécies do gênero *Anabaena* são capazes de produzir outros tipos de cianotoxinas como, por exemplo, saxitoxina, anatoxinas e anatoxina-a, todas neurotoxinas (Wiegand & Pflugmacher, 2004) e análises recentes realizadas no Laboratório de Ficologia com estas cepas mostraram que as duas são potenciais produtoras de saxitoxinas. É possível que *L. fortunei* não seja tão tolerante a saxitoxinas como é para microcistinas. Novos experimentos deveriam ser desenvolvidos no futuro, com o objetivo de se testar esta hipótese.

A taxa de produção de pseudofezes também foi maior para a cepa 24 que para a cepa 100 (9.85 e 2.55 cel/ind/mL respectivamente). A quantidade de pseudofezes produzida com a cepa 24 foi semelhante à produzida com *Chlamydomonas* sp. e *M. aeruginosa* cepa 19 (não tóxica).

Estes resultados confirmam a tolerância de *L. fortunei* a alimentos tóxicos, levantando outro fator importante ao estudar esses animais, que é o acúmulo de substâncias tóxicas em bivalves filtradores e sua transmissão ao longo da cadeia trófica (Darrigran & Coppola, 1994; von Ruckert et al., 2004). Isso poderia aumentar ainda mais os potenciais efeitos maléficos dessa espécie invasora nos ambientes em que ela se encontra.

Nessa primeira parte do trabalho é possível concluir que *L. fortunei* realiza seleção das partículas que ele filtra e essa seleção está provavelmente relacionada ao tamanho e a forma das partículas, dando preferência às de tamanho intermediário e formato arredondado. Além disso, o mexilhão por ser sésil, parece ter mais facilidade para captar as células capazes de se manter mais facilmente em suspensão na coluna d'água.

Assim como resultados apresentados em trabalhos anteriores (von Ruckert et al., 2004, Gazulha et al., 2012) a presença da microcistina não foi um fator negativo na seleção do alimento por *L. fortunei*, sendo este capaz de filtrar de forma eficiente *M. aeruginosa* tóxica. Wiegand & Pflugmacher (2005) sugerem que bivalves são capazes de estocar toxinas, como microcistina, nos lisossomos. Esse mecanismo já havia sido mencionado por Svenson et al., (2003) como meio de defesa de mexilhões contra uma espécie de molusco marinho dinoflagelado. Porém, ainda há possibilidade do mexilhão ser sensível à presença de saxitoxina, tendo em vista as baixas taxas de filtração registradas nos experimentos com relação às cepas de *Anabaena*.

5.2 Toxicidade Crônica

Os experimentos de taxa de filtração comprovaram que o mexilhão dourado é capaz de filtrar com eficiência cianobactérias sejam elas tóxicas ou não. A toxicidade do alimento não foi uma barreira para o mecanismo de filtração do animal e nem mesmo para a ingestão do alimento num período de teste curto.

Sendo assim a segunda parte desse estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações no metabolismo de *L. fortunei* quando em jejum e quando exposto a um alimento tóxico e de baixo valor nutritivo, como a cianobactéria *M. aeruginosa*, oferecida como única fonte de alimento por um período de tempo longo.

M. aeruginosa cepa 26 tóxica, utilizada como alimento, apresentou $0.015 \text{ pg.cel}^{-1}$ de microcistina-LR equivalente, e de acordo com a concentração de alimento administrada ($3 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$), correspondeu a um valor médio de $4.5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR. Esse valor é mais de quatro vezes maior que o limite permitido em água de consumo para seres humanos, que seria de $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, World Health Organization, 2004). Alguns trabalhos já testaram o acúmulo e a cinética de intoxicação de moluscos e bivalves com *Microcystis* (Vasconcelos, 1995; Zurawell et al., 1999; Amorim & Vasconcelos, 1999; Yokoyama & Park, 2002) porém nenhum trabalho havia sido feito com *L. fortunei* seguindo a metodologia proposta neste estudo e analisando, através dos índices de glicogênio e cálcio, se haveria alguma alteração fisiológica dos animais, quando alimentados com uma cianobactéria tóxica. O *Ankistrodesmus gracilis* foi a alga verde escolhida como alimento controle, por ser usada como alimento no cultivo de rotina dos moluscos.

As análises feitas com a concha de *L. fortunei* para estimativa da quantidade de cálcio mostraram que não houve diferença entre os grupos testados, nem mesmo durante os 24 dias experimentais. Magalhães et al., (2011) afirmam que em situações de estresse como jejum, infecção e contato com moluscicidas, os moluscos são capazes de alterar suas vias metabólicas assim como a mobilização de carbonato de cálcio. Paschoal & Amato (1996) em um estudo com *Biomphalaria glabrata*, infectados com *Schistosoma mansoni*, observaram que durante a infecção os moluscos depositavam mais cálcio nas conchas e na glândula digestiva em resposta ao maior gasto energético nesse período. No presente estudo não foram observadas alterações na quantidade de cálcio, isso pode sugerir que o tempo experimental não foi suficiente para afetar a estrutura da concha do mexilhão, porque mesmo no grupo jejum, onde não havia alimento para suprir as necessidades de cálcio do animal, não houve perda de material da concha.

O tempo de resposta a fatores de estresse pode variar de espécie para espécie e até mesmo de um espécime para o outro, dessa forma, para que ocorram alterações na estrutura da concha de *L. fortunei*, como por exemplo, na composição de cálcio, é possível que seja necessário um tempo superior a 24 dias de exposição do animal a possíveis fatores de estresse, como jejum e *M. aeruginosa* tóxica. Apesar de não terem ocorrido alterações nos níveis de cálcio nas conchas, podem ter ocorrido alterações em outras partes do corpo do mexilhão como na hemolinfa, células do manto e células musculares, lugares conhecidos como alvos de deposição de cálcio em outros moluscos como *B. glabrata* (Bielefeld et al., 1992). Porém seria necessária a realização de outros testes para confirmar essa hipótese.

O glicogênio é uma importante fonte primária de reserva energética para animais e bivalves em geral (de Zwann & Zandee, 1972; Barber & Blake, 1981; Haag et al., 1993). Alterações ambientais como temperaturas extremas, jejum, poluição, competição por alimento e espaço e ciclos reprodutivos, são alguns dos fatores relacionados com alterações nos níveis de glicogênio já descritas na literatura (de Zwann & Wijsmann, 1976; Hummel et al., 1989; Silva et al., 2012). Essas alterações parecem estar relacionadas a fatores de estresse do animal. Petterson et al. (1997) mostraram que a infestação por mexilhão zebra no rio Ohio diminuiu as taxas de glicogênio em três espécies de bivalves nativos: *Amblema plicata* (Say, 1817), *Quadrula pustulosa* (I. Lea, 1831) e *Fusconaia ebena* (I. Lea, 1831). Em 1999, os mesmos autores mostraram que essas mesmas espécies de bivalve, quando em jejum por um período de 30 dias, também apresentavam taxa de glicogênio inferior aos animais que ficaram pelo mesmo período de tempo sendo alimentados. De Zwann & Zandee (1972) mostraram a relação entre a variação sazonal do ambiente e a variação nas taxas de glicogênio em *M. edulis*. A concentração de glicogênio foi maior nos meses de primavera e verão onde há maior

disponibilidade de alimento e caiu nos meses de outono e inverno coincidindo com períodos de gelo e menor disponibilidade de alimento. Em um estudo sobre *Bulimulus tenuissimus*, Silva et al. (2012) observaram uma redução no glicogênio, coincidindo com o ciclo reprodutivo, por causa da energia necessária para acasalamento e gametogênese.

No presente trabalho é possível que os animais tenham ficado estressados com a manipulação e a aclimação antes do experimento e precisaram de um tempo maior para se acostumar com as condições experimentais, antes de começar a acumular glicogênio com valores similares ao grupo externo.

O grupo jejum continuou com níveis baixos de glicogênio, o que era esperado considerando a falta de suprimento energético. Apesar de baixos, os níveis permaneceram próximos aos valores encontrados na primeira semana, indicando que *L. fortunei* foi capaz de manter seu estoque de glicogênio. Esse fato pode estar relacionado à redução na atividade metabólica com objetivo de diminuir o gasto energético. Liebsch & Becker (1999) mostraram que *B. glabrata* é capaz de manter níveis constantes de glicose na hemolinfa mesmo em situações de jejum e que isso seria possível não apenas pela via glicogenolítica, mas pela capacidade gliconeogénica presente nesse molusco. Outros estudos deveriam ser feitos para avaliar a existência desse mecanismo em bivalves como *L. fortunei*.

Os experimentos de taxa de filtração mostraram que *L. fortunei* não apresentou taxas de filtração muito altas na presença de *Ankistrodesmus* sp., talvez devido a dificuldade de captação do alimento, de digestão ou pelo formato da célula. Esse comportamento pode ser uma possível explicação para o fato de o grupo controle ter levado um tempo maior para atingir níveis de glicogênio semelhantes ao grupo controle externo. O mesmo pode

ser considerado para o grupo de *M. aeruginosa*, que apresentou taxas maiores de filtração e conseguiu atingir já na segunda semana níveis de glicogênio semelhantes aos apresentados pelo controle externo.

A taxa de mortalidade baixa registrada confirma a resistência de bivalves, como *L. fortunei* a cianotoxinas confirmando estudos anteriores (Vasconcelos, 1995; Amorim & Vasconcelos, 1999; Vasconcelos et al., 2007). É possível que esses animais possuam uma via metabólica de depuração muito eficiente que impede que suas células sejam afetadas pelos compostos tóxicos ingeridos. Além disso, Vasconcelos et al. (2007), em estudos com o bivalve *Mytilus galloprovincialis*, mostraram que células intactas de *M. aeruginosa* não induziam nenhuma resposta nos moluscos.

Embora os bivalves deste estudo não tenham sido afetados pela presença de microcistinas intracelulares, alguns estudos mostraram que estes moluscos podem acumular toxinas em diversas partes do corpo (hepatopâncreas, intestino, massa visceral, brânquias, pé) (Chen & Xie, 2005; Vasconcelos et al., 2007). A presença do mexilhão dourado em locais com florações de cianobactérias, juntamente ao acúmulo de toxinas na cadeia trófica, poderia constituir um fator preocupante, pois as toxinas poderiam chegar de forma mais concentrada até os consumidores de níveis tróficos superiores. Porém outros estudos mostraram que moluscos, como *Dreissena polymorpha*, estão de alguma forma protegidos contra o acúmulo de quantidades elevadas e perigosas de cianotoxinas, devido a uma alta capacidade de depuração (Dionísio Pires et al., 2004), quando eles são capazes de eliminar as toxinas acumuladas. Diminuindo dessa forma, seu potencial de risco para os possíveis predadores.

Os experimentos apresentados neste trabalho abrem o caminho para que novas pesquisas sejam realizadas para se entender a dinâmica de alimentação e a fisiologia de *Limnoperna fortunei* na presença ou não de cianobactérias potencialmente tóxicas.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amado, L. L., Monserrat, J. M. 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environ.Int.*36:226–235.

Amorim, A., Vasconcelos, V. M., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37, 1041–1052.

Azevedo, S. M. F. O. 1996. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. Resumos do IV Simpósio da Soc. Bras. de Toxinol. Recife, Pe., p. 83.

Baker, S. M., Levinton, J. S., Kurdziel, J. P., Shumway, S. E. 1998. Selective feeding and biodeposition by zebra mussels and their relation to changes in phytoplankton composition and seston load. *J. Shellfish Res.* 17: 1207–1213.

Baker, S. M., Levinton, J. S., Ward, J. E. 2000. Particle transport in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Biological Bulletin*, vol. 199, p. 116-125.

Barber, B. J. and Blake, N. B. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 52:121-134.

Bastviken, D. T. E., Caraco, N. F., Cole, J. J. 1998. Experimental measurements of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) impacts on phytoplankton community composition. *Fresh Biology*, vol. 39, p. 375-386.

Berg, D. J., Fisher, S. W., Landrum, P. F. 1996. Clearance Processing of algal particles by Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *J. Great Lakes Res.* 22(3): 779-788. International Assoc. Great Lakes Res.

- Bielefeld, U., Zierold- Kortje, K. H., Becker, W. 1992. Calcium localization in the shell-forming tissue of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: a comparative study of various methods for localizing calcium. *Histochemical J* 24: 927-938.
- Boltovskoy, D., Sylvester, F., Otaegui, A., Leites, V., Cataldo, D. H. 2009. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. *Austral Ecology* 34, 719–730.
- Bontes, B. M., Verschoor, A. M., Dionisio Pires, L. M., Van Donk, E., Ibelings, B. W. 2007. Functional response of *Anodonta anatina* feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria, differing in shape, size and toxicity. *Hydrobiologia* 584:191–204.
- Burmester, V., Nimptsch, J., Wiegand, C. 2012. Adaptation of fresh water mussels to cyanobacterial toxins: Response of the biotransformation and antioxidant enzymes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78 296–309.
- Carmichael, W.W. 1996. Toxic Microcystis and the environment. In: Watanabe, Harada, K.I., Carmichael, W.W. and Fujiki, H. Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton. p.1-11.
- Castenholz, R. W., Waterbury, J. B. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J. T. et al. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins,. p. 1710-1799.
- Cataldo, D., Farrel, I. O., Paolucci E., Sylvester, F., Boltovskoy, D. 2005a. Efectos de *Limnoperna fortunei* sobre el fitoplancton y los nutrientes. III Congreso Argentino de Limnología, Chascomus, Argentina, 30 October–2 November 2005. p. 131.
- Chen, J. and Xie, P. 2005. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical

China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology* Volume 20, Issue 6, pages 572–584.

Chorus, I.; Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: World Health Organization.

Darrigran, G. A.; Coppola, A. 1994. Los bivalves invasores del Rio de La Plata. Su potencial uso como bioindicadores ambientales. *Tankay*, v. 1, p. 150 – 152.

Darrigran, G., Pastorino, G. 1995. The Recent Introduction of a Freshwater Asiatic Bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. *The Veliger* 38: 171–175.

Darrigran, G. 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biol Invasions* 4: 145–156.

Darrigran, G., Damborenea, C., Greco, N. 2007. Freshwater invasive bivalves in man-made environments: A case study of larvae biology of *Limnoperna fortunei* in a Hydroelectric Power Plant in South America. *Ambio* 36: 575–579.

Darrigran, G., Damborenea, C. 2009. *Introdução a Biologia das Invasões: O Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle*. Editora Cubo. Cap. 1: Bioinvasões.

Darrigran, G., Damborenea, C. 2011. Ecosystem Engineering Impact of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science* 28: 1–7.

Davids, C. 1964. The influence of suspensions of microorganisms of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel (*Mytilus edulis*). *Neth J Sea Res* 2:233-249

Davis, M. A. and Thompson, K. 2000. Eight ways to be a colonizer, two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *Bull. Ecol. Soc. Am.* 81: 226-230.

de Zwann, A. and Zandee, D. I. 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comparative biochemistry and Physiology* 43A:53-58.

de Zwann, A. and Wijsman, T. C. M. 1976. Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comparative biochemistry and Physiology* 54B:313-324.

Dionisio Pires, L. M. and Van Donk, E. 2002. Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* 47: 1855 – 1865.

Dionisio Pires, L. M., Jonker, R. R., Van Donk, E., Laanbroek, H. J. 2004. Selective grazing by adults and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): application of flow cytometry to natural seston. *Freshwater Biology* 49, 116–126.

Dionisio Pires, L. M., Karlssonb, K. M., Meriluotob, J. A. O., Kardinaalc, E., Visserc, P. M., Siewertsena, K., Van Donk, E., Ibelings, B. W. 2004. Assimilation and depuration of microcystin–LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* Volume 69, Issue 4, 20 September 2004, Pages 385–396.

Dionisio Pires, L. M., Bontes, B. M., Van Donk, E., Ibelings, B.W. 2005a. Grazing on colonial and filamentous, toxic and nontoxic cyanobacteria by the zebra mussels *Dreissena polymorpha*. Journal of Plankton Research 27: 331 – 339.

Dionisio Pires, L. M., Bontes, B. M., Samchyshyna, L., Jong, J., Van Donk, E., Ibelings, B. W. 2007. Grazing on microcystin-producing and microcystin-free phytoplankters by different filter-feeders: implications for lake restoration. Aquatic Science Vol. 69.

Elton, C. H. S. 1958. The Ecology of Invasions by animals and plants. Catalogue 6041/U. Methuen and CO LTD. Great Britain 181 pp.

Fernandes, S., Welker, M., Vasconcelos, V. M. 2009. Changes in the GST Activity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during exposure and depuration of microcystins. Journal of Experimental Zoology 311A:226–230.

Gandolfi, S. M., Simeão, C. M. G., Diniz, D. M. A., Coscarelli, D., Vidigal, T. H. D. A., Martinez, C. B. 2009. “Elaboração e construção de um laboratório para criação de *Limnoperna fortunei* (bivalvia, mytilidae),” XVIII simpósio brasileiro de recursos hídricos, Campo Grande, Editora do XVIII Simpósio brasileiro de recursos hídricos, pp. 1 – 10.

Gazulha, V. 2010. O mexilhão dourado *Limnoperna Fortunei* (Dunker, 1857) na presença de cianobactérias: taxas de filtração, comportamento alimentar e sobrevivência. Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Gazulha, V., Mansur, M. C. D., Cybis, L. F., Azevedo, S. M. F. O. 2012. Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. *Braz. J. Biol.*, vol. 72, no. 1, p. 33-39.

Gazulha, V., Mansur, M. C. D., Cybis, L. F., Azevedo, S. M. F. O. 2012. Feeding behavior of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) under exposure to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Braz. J. Biol.*, vol. 72, no. 1, p. 41-49.

Haag, W. R., Berg, D. L., Garton, D. W., Farris, J. L. 1993. Reduced survival and fitness in native bivalves in response to fouling by the introduced zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in western Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50 (1):13-19.

Higgins, P. J. 1980. Effects of food availability on the valve movements and feeding behavior of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). II Feeding rates and behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* v.46. p. 17-27.

Horgan, M. J. and Mills, E. L. 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): implications for freshwater lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. v.54. p.249 -255.

Hummel, H., de Wolf, L., Zurburg, W., Apon, L., Bogaards, R. H., Van Ruitenburch, M. 1989. The glycogen content in stressed marine bivalves: the initial absence of a decrease. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94B (4):729-733.

IUCN. 2000. Guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species. 51st Meeting IUCN Council, Gland, Switzerland.

Jones, C. G., Lawton, J. H., Shachak, M. 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78: 1946–1957.

Jørgensen, C. B. 1990. Bivalve filter feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen, 140 pp.

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S. C., O'Riordan, R. M., James, K. F., Furey, A., Allis, O. 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. *Aquatic Toxicology* 79:391–400.

Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Padilla, D. K. 1997. The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in Eastern Europe. *J. Shellfish Res.* 16:187–203.

Karatayev A. Y., Burlakova, L. E., Padilla, D. K. 2002. Impacts of zebra mussels on aquatic communities and their role as ecosystem engineers. In “Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management” Ed by E Leppäkoski, S Gollasch, S Olenin, Kluwer, Dordrecht, pp 433–446.

Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., Padilla, D. K., Burlakova, L. E. 2007. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. *J Shellfish Res* 26: 205–213.

Kjørboe, T. and Møhlenberg, F. 1981. Particle selection in suspension-feeding bivalves. *Marine Ecology – Progress Series*, Berlin, v. 5, p. 291-296.

Komarek, J. and Anagnostidis, K. 2000. Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In: Ettl, H., Gardner, G., Heynig, H. and Mollenheuer, D. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer, Jena, v.19, p.1-548.

Kryger, J. and Riisgard, H. U. 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia (Berl.)* 77: 35–37.

- Lance, E., Brient, L., Bormans, M., Gerard, C., 2006. Interactions between cyanobacteria and Gastropods. I. Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. *Aquat. Toxicol.* 79, 140–148.
- Liebsch, M and Becker, W. 1999. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*.
- Lockwood, J., Hoopes, M., Marchetti, M. 2007. *Invasion ecology*. Blackwell, Oxford.
- Magalhães, A. C., Pinheiro, J., Mello-Silva, C. C. 2011. A Mobilização do cálcio em *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes quantidades de carbonato de cálcio. *Revista de Patologia Tropical* Vol. 40 (1): 46-55.
- Magara, Y., Matsui, Y., Goto, Y., Yuasa, A. 2001. Invasion of the nonindigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. *Aqua J. Water Supp. Res. Technol.* 50:113–124.
- Mansur, M. C. D.; Richinitti, L. M. Z.; Santos, C. P. 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), molusco bivalve invasor, na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 147-149.
- Montalto, L., Oliveros, O. B., Ezcurra de Drago, I., Demonte, L. D. 1999. Peces del río Paraná Medio predadores de una especie invasora: *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae). *Revista FABICIB*, v. 3, p. 85-101.
- Morton, B. 1973. Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia: Mytilacea). *Malacologia* 12: 265–281.

- Mostafa, O. M. S. 2007. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. *Parasitol Res* 101: 963-966.
- Oberholster, P. J., Botha, A. M., Grobbelaar, J. U. 2003. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. *Afr. J. Biotechnol*, v. 3, p.159-168.
- Oliveira M. D., Hamilton S. K., Jacobi C. M. 2010. Forecasting the expansion of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei* in Brazilian and North American rivers based on its occurrence in the Paraguay River and Pantanal wetland of Brazil. *Aquatic Invasions*, Volume 5, Issue 1: 59-73.
- Owen, G. 1974. Feeding and digestion in the Bivalvia. *Adv. Comp. Physiol. Biochem*, San Diego, v. 5, p. 1-35.
- Pareschi, D. C., Matsumura-Tundisi, T., Medeiros, GR., Luzia, A. P., Tundisi, J. G. 2008. First occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the Rio Tietê watershed (São Paulo State, Brazil). *Braz. J. Biol.*, 68(4, Suppl.): 1107-1114.
- Paschoal, S. V., Amato, S. B. 1996. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) em *Bradybaena Similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): Alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. *Rev Bras Zool* 13: 411-418.
- Pastorino, G., Darrigran, G. A., Martin, S. M., Lunaschi, L. 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica* 39: 34.
- Penchaszadeh, P. E. 2000. Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens valenciennes*, 1846

(Anostomidae) in the rio de la Plata, Argentina. *Journal of Shellfish Research*, v. 19, n.1, p. 229-231.

Pestana, D., Ostrensky, A., Boeger, W. A. P., Pie, M. R. 2009. The Effect of Temperature and Body Size on Filtration Rates of *Limnoperna Fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) under Laboratory Conditions. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.52 n.1: pp. 135-144, Jan/Feb.

Petterson, M. A., Parker, B. C., Neves, R. J. 1997. Effects of quarantine times on glycogen levels of native freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) previously infested with zebra mussels. *American Malacological Bulletin* 14(1):75-79.

Pinheiro, J. and Gomes, E. M. 1994. A method for glycogen determination in molluscs. *Bras. Arch. Biol. Tech.*, 37, 569-576.

Prieto, A. I., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, I., Camean, A. M. 2007. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat.Toxicol.*84:337–345.

Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemela, S. I. 1997. Variation of microcystins cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.6, p.2206-2212.

Reeders, H. H., Bij de Vaate, A. and Slim, F. J. 1989. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. *Freshwater Biology* 22: 133–141.

Reeders, H. H. and Bij de Vaate, A. 1990. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* 200/201: 437–450.

- Roberts, K., Grief, C., Hills, G. J., Shaw, P. J. 1985. Cell wall glycoproteins: structure and function. *Journal of Cell Science*, 2, 105–127.
- Root, E. 1981. Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Scheiwiz. Z. Hydrol.*, v. 43, p. 35-62.
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M. J. 2001. Detección de Cianobacterias y sus Toxinas: Una Revisión. *Toxicol, Madrid*, v. 18, p. 65-71.
- Sabatini, S. E., Brena, B. M., Luquet, C. M., San Julia, M., Pirez, M., Molina M. C. R. 2011. Microcystin accumulation and antioxidante responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis patagonicus* upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:1188–1194.
- Salomon, P. S., Yunes, J. S., Parise, M., Cousan, J. C. B. 1996. Toxicidade de um Extrato de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa dos Patos sobre Camundongos e suas Alterações sobre o Tecido Hepático. *Vitalle*, v. 8, p. 23-32.
- Schulte, E. H. 1975. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 30:331-341.
- Segade, M. E., Collm, N. S., Viau, V. E., Dorado, J., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M. 2003. Tasa metabólica de *Limnoperna fortunei*, en función del peso corporal y la temperatura de aclimatación. I Jornadas de Ciencias Naturales del NOA, VIII Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Salta 24, 25 y 26 de Septiembre.
- Silva, L., Meireles, L., Junqueira, F. O., Pinheiro, J., Bessa, E. C. A. 2012. Seasonal changes of energy reserves in *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae). *Animal Biology* 62:111–118.

Sprung, M., and Rose, U. 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77:526-532.

Sumner, J. B. 1925. A method for colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chemistry*, 65, 393.

Svenson, S., Sarngren, A., Forlin, L. 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquat. Toxicol.* 65, 27– 37.

Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juarez, A., Cataldo, D. 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia* v.534. p. 71-80.

Soido, C., Vasconcellos, M. C., Diniz, A. G., Pinheiro, J. 2009. An Improvement of calcium determination technique in the shell of molluscs. *Brz Arch Biol Tecnol* 52: 93-98.

Van Donk, E., Lurling, M., Hessen, D. O., Lokhorst, G. M. 1997. Altered cell wall morphology in nutrient deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnology and Oceanography*, 42, 357–364.

Vanderploeg, H. A., Liebig, J. R., Carmichael, W. W., Agy, M. A., Johengen, T. H., Fahnenstiel, G. L., Nalepa, T. F. 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Can.J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 58, p. 1208-1221.

Vanderploeg, H. A., Nalepa, T. F., Jude, D. J., Mills, E. L., Holeck, K. T., Liebig, J. R., Grigorovich, I. A., Ojaveer, H. 2002. Dispersal and emerging ecological impacts of

Ponto-Caspian species in the Laurentian Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1209–1228.

Vasconcelos, V. M. 1995. Uptake and depuration of the peptide toxin microcystin-LR in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 32, 227–237.

Vasconcelos, V. M. 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz J Med Biol Res* 32:249–254.

Vasconcelos, V. M., Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2007. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon* 50: 740–745.

Von Rückert, G., Campos, M. C. S. e Rolla, M. E. 2004. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria *Acta Scientiarum Biological Sciences* v.26 .n.4. p.421-429.

WHO (World Health Organization). 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters. Chapter 8, Algae and cyanobacteria in fresh water. Geneva.

WHO (World Health Organization). 2004. Guidelines for drinking water quality. Volume 1. Recommendations. 3rd edition. WHO Publishing, Geneva.

Widdows, J., Worrall, C., Fieth, P. 1979. Relationship between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Mar Biol* 50:195-207.

Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 201–218.

Yokoyama, A. and Park, H. 2002. Depuration Kinetics and Persistence of the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR in the Freshwater Bivalve *Unio douglasiae*. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Zurawell, R. W., Kotak, B. G., Prepas, E. E. 1999. Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. *Freshwater Biol.* 42, 707–718.