Helena Aparecida dos Santos Lima ^{me}Pereira

Ø

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA AÇÃO ALGICIDA DO
SULFATO DE COBRE, EM ESPECIAL SOBRE A CIANOFÍCEA
Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo como um dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Samuel Mürgei Branco

**São Paulo
1978**

BIBLIOTECA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEDICATÓRIA

A meu esposo

José Lourenço

e meus filhos

Ana Lúcia

Carlos Augusto e

Maria Isabel,

com carinho e gratidão

H O M E N A G E M

Ao Prof. Dr. Samuel Murgel Branco,
orientador deste trabalho,
e à sua esposa Dra. Wilma Cardinale Branco pelo apoio e incentivo que me proporcionaram. Sou-lhes profundamente grata por todos os ensinamentos e também pela amizade e paciência que sempre demonstraram.

RECONHECIMENTO

À CAPES - Coordenação do Aperfeicoamento
to de Pessoal de Nível Superior pelos
subsídios concedidos para a elaboração
do presente trabalho.

A G R A D E C I M E N T O S

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Aristides Almeida Rocha pela valiosa colaboração prestada no acompanhamento do trabalho.

Aos Pesquisadores Científicos, Biólogos do Instituto de Botânica de São Paulo, Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, Dra. Rosa Maria Teixeira Bicudo e Dra. Célia Romano Leite Sant'Anna pelo auxílio na identificação de algas bem como pela leitura crítica dos manuscritos e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Antonio Lamberti e seus auxiliares pela valiosa cooperação no que se refere à técnica de cultivo de cianofíceas.

Aos Prof. Dr. Dácio de Almeida Christovão, Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria e Dr. José Alberto Neves Candeias assim como ao Sr. José Morais de Godói

do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que tornaram possível a utilização do laboratório, material e equipamento para filtração da água coletada em membrana milíporo.

À Sra. Marlene Lopes Assis de Souza pela amizade e pelo assessoramento na elaboração dos meios de cultura.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública pela localização de referências bibliográficas.

Às Srtas. Miriam Borges Xavier, Cleide Machado Chaves e Nancy Reinhardt pela colaboração na busca de bibliografia correlacionada ao assunto do trabalho.

Aos colegas Dr. José Maria Pacheco de Souza e Dra. Sabina Lea Davidson Gotlieb, do Departamento de Epidemiologia pela apreciação dos resultados e sugestões oferecidas.

À Sra. Adelaide Rosas Forte pela amizade e esmero no serviço datilográfico.

Ao Sr. Rubens Gomes de Oliveira pela cooperação no trabalho de montagem dos exemplares.

A todos os funcionários do Departamento pelo convívio amigo.

À C.P.G., Comissão de Pós Graduação, pelo pronto atendimento e pela atenção dispensada em todas as ocasiões.

Ao Prof. Valério Testa, do Instituto de Idiomas Yázigí pela revisão da versão do resumo em inglês.

E por fim, mas não em último lugar a meus pais, Prof. Dr. Geraldo dos Santos Lima Filho e Julieta Minucci dos Santos Lima pelo apoio irrestrito e colaboração na versão do resumo para o Esperanto.

Í N D I C E

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Generalidades sobre as cianofíceas	2
1.2. Consequências da presença de cianofíceas em águas destinadas ao abastecimento e recreação.	4
1.3. Processos de Controle de Algas	6
1.3.1. Aspectos históricos do cultivo de algas	11
1.3.2. Sinopse e considerações sobre testes de toxicidade	16
1.4. Objetivos	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1 - Esquema das relações entre tempo de contato
e concentração de um agente algicida.....

FIG. 2 - Gêneros de algas presentes nas culturas ...

ÍNDICE DE QUADROS

Pág.

QUADRO 1- Comparação da resistência de algumas linhagens de cianofíceas ao C.M.U.(3.p.clorofenil 1.1. dimetiluréia) em meio de Allen (1952); concentração inicial de 300.000 células/ml (Fitzgerald,1964b)...	24
QUADRO 2- Efeito da prata nas propriedades algísticas do cobre sobre a cianofícea <u>Microcystis aeruginosa</u> (Wis.1036). Meio de Gorham sem E.D.T.A.(ácido etilenodiamino tetracético) 1000.000 células/ml (Fitzgerald & Faust, 1963b)	26
QUADRO 3- Efeito do cobre nas propriedades algísticas da prata sobre a clorofícea <u>Chlorella pyrenoidosa</u> (Wis.2005). Meio de Allen, 300000 células/ml(Fitzgerald & Faust 1963b).....	27
QUADRO 4- Meio de Chu modificado	32
QUADRO 5- Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	41

QUADRO 6- Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	42
QUADRO 7- Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	43
QUADRO 8- Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	44
QUADRO 9- Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	45
QUADRO 10- Número de conjuntos por mililitro an- tes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	46

RESUMO

Contribuição ao conhecimento da ação algicida do sulfato de cobre, em especial sobre a cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner.

O presente trabalho descreve a técnica empregada para a obtenção de culturas unialgáceas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner e de culturas mistas onde coexistiam vários gêneros de algas mas com predominância da referida cianofícea, simulando a situação do ambiente natural. Estas culturas foram expostas a 0,1 mg/l e 0,2 mg/l do algicida $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) por períodos variáveis de tempo. A espécie Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, quando em cultura unialgáceas, resistiu por mais tempo à ação do algicida do que quando em culturas mistas.

ABSTRACTS

Contribution to the knowledge on copper sulfate as an algicide, with special reference to the blue-green alga Microcystis flos-aquae(Wittrock) Kirchner.

The present work describes the techniques employed in order to obtain unialgal cultures of Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner as well as mixed cultures where other genera of algae were present but Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner was by far more numerous similarly as it occurs in nature. These cultures were exposed to 0,1mg/l and 0,2mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pentahydrate copper sulfate) through variable periods. Unialgal cultures of Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner resisted longer to the algicide than mixed ones.

RESUMO

Kontribuo al scio pri algmortiginta ago per kupra sulfato, speciale sur la cianoficea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner.

Ĉeestanta verko rakontas la teknikon utiligatan por havigi kulturadojn unualgajn de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner kaj miksajn kulturadojn, en kiuj sametempe ekzistas diversaj algal specoj, sed kun supereco de la aludita cianoficea, ŝajnigante stato de natura ĉirkaŭaĵo.

Tiuj kulturadoj estis elmetaj al 0,1 mg/l kaj 0,2 mg/l da algmortiginta $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Kupra kvinhidrata sulfato) dum variemaj tempaj periodoj.

La speco Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, kiam en unualga kulturado, rezistis pli tempe al algmortiginta ago ol kiam en miksaj kulturadoj.

1. INTRODUÇÃO

A palavra algicida é empregada para designar qualquer agente químico, natural ou artificialmente sintetizado, capaz de, influenciando na fisiologia celular, eliminar algas.

O termo algas, entretanto, tem sido empregado de modo muito abrangente indicando um conjunto tão heterogêneo de organismos que atualmente não apresenta um significado preciso. Na sua aceção mais ampla incluiria todos os talófitos e protistas clorofilados e, inclusive, certos organismos despigmentados.

Também, quanto à morfologia, a designação algas é generalista, pois entre estes vegetais são encontrados desde seres unicelulares, que não apresentam acentuada diferenciação, organismos coloniais, filamentosos, sifonáceos, até indivíduos com certa diferenciação celular em tecidos especializados para o desenvolvimento de diversas funções.

Em consequência, as dimensões dos organismos incluídos neste grupo variam desde alguns micrômetros até umas poucas dezenas de metros de comprimento. Os processos de reprodução também são extremamente variados envolvendo mecanismos vegetativos, assexuais e sexuais.

O único caráter comum a todos os organismos incluídos sob a denominação algas (com exceção das caráceas) é a ausência do envoltório multicelulado estéril dos esporângios e gametângios (estruturas no interior das quais são produzidos, respectivamente, esporos e gametas). (Bicudo e Bicudo, 1970).

Com exceção de regiões arenosas desérticas extremamente áridas, as algas podem ocorrer em todos os ambientes; mas, o meio onde ocorrem mais frequentemente é o aquático. Como os demais seres vivos, ao se desenvolverem em qualquer ambiente, provocam alterações das características físicas e químicas do meio. Assim, as algas que se desenvolvem em mananciais destinados ao abastecimento e recreação promovem modificações e oscilações nas características físicas e químicas das águas ocasionando, por vezes, sérios prejuízos, permanentes ou temporários, à utilização destes corpos de água. As alterações mais conspícuas são, em geral, provocadas pelo grupo das algas azuis ou cianofíceas.

1.1. GENERALIDADES SOBRE AS CIANOFÍCEAS

O termo cianofíceas (algas azuis) designa um grupo bastante primitivo de vegetais, unicelulares ou multicelulares, filamentosos, de vida livre ou coloniais, que apresentam o material nuclear e os pigmentos (dentre os quais a c-ficocianina responsável pela denominação da clas-

se não contidos em formações especiais, mas difusos no protoplasma.

A coloração das células varia de verde-azulado, verde-oliva, vermelho, amarelo, violeta até negro, de acordo com a espécie considerada e com as características do ambiente onde se desenvolvem.

Algumas espécies apresentam vacúolos de gás (pseudo-vacúolos) dispersos no citoplasma.

As células podem apresentar membranas finas ou espessas, homogêneas ou estriadas, frequentemente mucilaginosas, incolores ou às vezes dotadas de pigmentação. Algumas formas podem apresentar movimentos provavelmente associados à produção de mucilagem.

Em alguns gêneros filamentosos é possível observar-se a ocorrência de tipos de células especiais, quais sejam: os heterocistos e acinetos. Os heterocistos são células destituídas de pigmentos e apresentam paredes espessadas. Sua função não é totalmente conhecida, parecendo, todavia, desempenhar papel importante na fixação biológica de nitrogênio molecular. Representariam, ainda, um ponto de fraqueza no tricoma, onde ocorre, via de regra, a fragmentação do fio. Os acinetos são esporos desprovidos de locomoção própria são células de resistência, de parede espessa, ricas em reservas alimentares, capazes de superar condições hostis e, posteriormente, formar novo filamento.

A reprodução destes organismos faz-se por simples divisão da célula ou do tricoma (conjunto de células, alinhadas, sem levar em consideração a bainha mucilaginosa). A divisão processa-se a partir da parede celular,

com formação centrípeta do septo divisório. Alguns gêneros filamentosos produzem hormogônios, isto é, fragmentos de poucas células do tricoma, dotados de movimento próprio, e que abandonam o filamento para crescimento. Em alguns casos, estes fragmentos apresentam-se envoltos por um revestimento protetor destinado a preservar o hormogônio contra condições adversas. São neste caso, denominados hormocistos. Não são conhecidos estágios sexuais e nem formas flageladas entre as cianofíceas.

A sistemática destes organismos ainda é bastante controvertida. Round (1965) coloca-os na divisão Cyanophyta, que apresenta apenas uma classe, Cyanophyceae, dividida em quatro ordens, a saber: Chroococcales, Chamaesiphonales ou Dermocarpales, Pleurocapsales e Hormogonales ou Oscillatoriales.

Para Bourrelly (1970) a classe Cyanophyceae compreende cinco ordens, 22 famílias, 111 gêneros e aproximadamente 1300 espécies.

1.2. CONSEQUÊNCIAS DA PRESENÇA DE CIANOFÍCEAS EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO E RECREAÇÃO

As algas podem em geral, ser encontradas em todas as coleções de água expostas à luz e são responsáveis por cerca de 90% de toda atividade fotossintetizante do globo (Meyer, 1971). Cada grama de alga produz cerca de 15 gramas de oxigênio por dia, (Mackenthun & Ingram, 1964).

A eutrofização das águas continentais, decorrente da concentração da população humana em áreas urbanizadas, em consequência de despejos inadequadamente tratados,

bem como da drenagem de campos de culturas, tem produzido uma elevação do número de organismos fitoplanctônicos e, em especial, de cianofíceas dos corpos de água receptores. Assim, o lago Washington, que em 1959 continha um volume de cerca de $1,5 \times 10^6 \mu^3$ de fitoplancton/ml, sendo aproximadamente 15% constituídos de cianofíceas, em 1963 decuplicou esse volume ao passar a apresentar 95% de cianofíceas (Bartsch, 1967).

As cianofíceas provocam direta ou indiretamente problemas relacionados ao abastecimento e recreação. Os transtornos causados por estes organismos relacionam-se tanto com a sua presença como com as conseqüências que esta presença traz para o meio.

O desenvolvimento de grandes quantidades de algas em corpos de água produz o que se convencionou chamar "floração", ou seja, um acúmulo superficial de grande número destes organismos, causando efeito estético bastante desagradável, acentuando a turbidez e conferindo sabor e odor à água infestada.

Nestas condições, o próprio metabolismo das algas pode produzir flutuações de pH que interferem com a coagulação e floculação realizadas na estação de tratamento. Uma grande massa de organismos planctônicos na água do manancial pode levar à diminuição de vazão e mesmo obstrução de filtros, formação de bolas de lodo ("mud-balls"), etc (Branco, 1971).

A par disto, algumas cepas de certas espécies de cianofíceas produzem uma endotoxina muito violenta que se convencionou chamar F.D.F. ("fast death factor", ou

seja, fator de morte rápida) a qual, quando inoculada em camundongos, na proporção de 0,5 mg/kg de peso do animal, provoca sua morte em aproximadamente uma hora. (Bishop et al., 1959). Esta toxina parece não produzir efeito em peixes quando em concentração de até 10 mg/l (Maloney & Carnes, 1966).

Dentre as cianofíceas a espécie Anabaena flos-aquae (Lyngb.) De Bréb. pode produzir uma toxina ainda mais violenta, V.F.D.F. ("very fast death factor", ou seja, fator de morte extremamente rápida) que, nas mesmas condições, produz a morte de camundongos em apenas 1 a 10 minutos (Gorham, 1964).

Entretanto, enquanto a toxina F.D.F. é resistente ao calor e passa inalterada pelos processos normais de tratamento de água (Wheeler et al., 1942), a toxina V.F.D.F. é sensível ao calor e aos álcalis e facilmente adsorvida pelo carvão ativado, além de ser completamente neutralizada pela floculação com sulfato de alumínio. (Gorham et al., 1964).

Além disto, quando em "floração", mesmo as cianofíceas não produtoras de toxinas podem, ao entrar em decomposição, provocar o aparecimento de condições anaeróbias, propícias ao desenvolvimento de bactérias produtoras de toxinas.

1.3. PROCESSO DE CONTROLE DE ALGAS

Para controlar o desenvolvimento de microrganismos que podem causar problemas para o abastecimento ou recreação, podem ser empregados dois tipos de tratamen-

to, ou sejam: os processos preventivos e os corretivos.

A maioria dos autores concorda em que os processos preventivos, que atuam sobre os fatores ecológicos relacionados ao desenvolvimento de organismos, são preferíveis aos corretivos, que se valem da introdução no ambiente de tóxicos para as espécies causadoras de problemas.

Entretanto, o contínuo desenvolvimento das cidades, o crescimento demográfico, a industrialização, o uso crescente de fertilizantes na lavoura, o aumento da erosão e transporte de sais minerais conseqüentes à eliminação de vegetação, têm acelerado assustadoramente e, na maioria das vezes, de forma incontrolável o processo de eutrofização das águas.

Por outro lado, os processos preventivos exigem condições favoráveis quanto à topografia, controle de fontes de nutrientes, etc, que nem sempre são encontradas na prática.

Deste modo, da mesma forma como ocorreu no passado com relação às bactérias patogênicas e desinfetantes, o controle de algas também está se tornando cada vez mais dependente dos processos corretivos (Branco, 1962).

O grande inconveniente dos algicidas, em relação aos bactericidas, reside no fato de terem de ser aplicados no próprio manancial, causando alterações ecológicas.

O principal objetivo do controle de algas em águas de abastecimento e recreação é impedir o desenvolvimento de espécies nocivas. Geralmente, é mais fácil pro

mover uma alteração de espécies dominantes do que impedir todo e qualquer crescimento de algas. De um modo geral, a aplicação do algicida provoca o desaparecimento de algumas espécies, permitindo o desenvolvimento de outras que passam a predominar. Na prática, pois, o controle de algas resume-se em identificar as espécies causadoras de problemas e determinar o grau de controle necessário para corrigir a situação de desequilíbrio.

A literatura sobre os mecanismos de ação e métodos de aplicação de algicidas em águas destinadas ao abastecimento e recreação é bastante extensa. Como exemplo podemos citar os seguintes trabalhos: Moore & Kellerman, 1904; Ellms, 1905; Nason, 1938; Turre, 1939; Moyle, 1949; McIntyre, 1949; Bowser, 1951; Bussy, 1952; Fitzgerald et al., 1952; Williams et al., 1952; Derby & Townsend, 1953; Bartsch, 1954; Fitzgerald & Skoog, 1954; Nesin & Derby, 1954; Ringer & Campbell, 1955; Maloney & Palmer, 1956; McCallan, 1956; Monie, 1956; Palmer, 1956; Hale, 1957; Reddish, 1957; Mackenthun, 1958; Maloney, 1958; Owens & Blaak, 1960; Stepanek et al., 1960; Fitzgerald & Faust, 1963a, 1963b; McKee & Wolf, 1963; Fitzgerald, 1964 a, 1964b, 1964c; Fitzgerald & Faust, 1964; Skidmore, 1964; Allen, 1966, Azevedo Netto, 1966; Fitzgerald, 1966, Kemp et al., 1966, Otto & Bartley, 1966; Fitzgerald, 1967, Riemer & Toth, 1967; Branco & Pereira, 1968; Sladeckova & Sladeck, 1968; Toth & Riemer, 1968; Zweig et al., 1968; Mackenthun, 1969, Fitzgerald, 1971; Prows, 1971, Prows & McIlheny, 1973; Buitron, 1974; Singh, 1974; Carr, 1976.

Os trabalhos de Zehnder & Hughes, 1958; Foster et al., 1963, Krauss, 1962; Perlman, 1964; Vance, 1966,

e Whitton, 1968, mencionam o efeito algicida de alguns antibióticos.

Em princípio, para avaliar o efeito de qualquer algicida proposto para solucionar problemas causados por algas em águas de abastecimento, deve-se testá-lo com as próprias espécies causadoras de problemas. Isto pode ser realizado no campo ou no laboratório.

Fitzgerald et al., (1952) testaram em tanques e lagoas e Stepanek et al., (1960) empregaram grandes sacos plásticos contendo água de lagoas e as algas a serem combatidas.

Porém, nem sempre é viável trabalhar no campo. Para estudar a eficiência de vários agentes químicos em concentrações diversas, é mais prático trabalhar no laboratório. Uma das maneiras de realizar os testes é levar ao laboratório amostras de água e aplicar o algicida. Neste caso, como freqüentemente as algas tendem a morrer, por não se adaptarem às novas condições, só se pode calcular o efeito do algicida em termos de aceleração na taxa de morte em relação à que ocorre em frascos-controle, aos quais não foi aplicado agente algum. Isto limita a aplicabilidade apenas aos compostos que agem muito rapidamente (Fitzgerald, 1971).

Para a realização de testes reprodutíveis é necessário fazer avaliações preliminares com espécies que se desenvolvam facilmente em culturas, já adaptadas aos meios. Estas podem ser conseguidas em laboratórios que forneçam espécimes em culturas puras.

Há que se levar em conta, entretanto, que

mesmo espécies taxonomicamente relacionadas com as espécies causadoras de problemas nem sempre reagem aos algicidas de maneira análoga a estas últimas. Por exemplo, poder-se-ia pensar em aplicar 2.3.D.N.Q. (2.3. dicloronaftoquinona) a Coccochloris peniocyctis (Kützting) Drouet & Daily e Nostoc muscorum C. Agardh, que são facilmente cultivadas em laboratório e utilizar os resultados para avaliar o efeito nas espécies Microcystis aeruginosa (Kützting) Elenkin e Anabaena circinalis Rabenhorst. Entretanto, as duas primeiras espécies são relativamente resistentes ao 2.3.D.N.Q.(2.3. dicloronaftoquinona), enquanto as duas últimas são muito sensíveis (Fitzgerald et al., 1952; Fitzgerald & Skoog, 1954).

Por outro lado, certos grupos de algas causadoras de transtornos análogos reagem de modo semelhante a determinados agentes químicos. Por exemplo, as cianofíceas produtoras de floração Microcystis aeruginosa (Kützting) Elenkin, Anabaena circinalis Rabenhorst, e Gloeothrichia echinulata (Smith) Richter são sensíveis a doses de sulfato de cobre que variam de 0,05 a 0,1 mg/l, enquanto são necessários mais de 3 mg/l para impedir o crescimento da clorofícea Chlorella pyrenoidosa Chick (Fitzgerald & Faust, 1963a, 1963b). É claro que, neste caso, se as algas causadoras de problemas forem cianofíceas, os testes de toxicidade do sulfato de cobre realizados com Chlorella pyrenoidosa Chick produzirão resultados acima do real.

Por outro lado, o fato das cianofíceas mostrarem-se mais sensíveis ao 2.3. D.N.Q.(2.3. dicloronaftoquinona) e ao sulfato de cobre (Lange, 1944; Fitzgerald et al., 1952, Fitzgerald & Faust, 1963a) não significa que sejam também mais sensíveis a outros agentes.

O sulfonato de alquilbenzeno impede o crescimento de representantes dos gêneros Aphanizomenon Morren e Anabaena Bory quando em concentração de 5 mg/l, mas 60mg/l do mesmo agente somente produzem inibição no desenvolvimento de Microcystis aeruginosa ("Kützting) Elenkin ou Chlorella Beijerinck (Fitzgerald, 1964b).

Portanto, uma vez selecionadas as algas a serem submetidas à aplicação de determinado algicida, é necessário cultivá-las.

1.3.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DO CULTIVO DE ALGAS

Bold (1942) cita Famintzin como sendo, em 1871, o precursor do cultivo de algas em laboratório utilizando como meio de cultura uma solução destinada a propiciar o desenvolvimento de plantas superiores.

Entretanto, somente com Beijerinck (1890) é que se inicia o progresso neste setor. Este autor utiliza como meio de cultura inicialmente a própria água onde as algas foram encontradas e descreve as técnicas empregadas para obter culturas puras de Chlorella Beijerinck e Scenedesmus Meyen. Posteriormente, passa a enriquecer a água com substâncias orgânicas e minerais voltando, deste modo, ao tipo de cultivo empregado por Famintzin.

Noll (1892) e Oltmanns (1892) tratam da cultura de algas marinhas, sendo que Noll (1892) recomenda a adição de compostos de fósforo e nitrogênio à água, prática esta até hoje empregada pelos pesquisadores.

Ainda em 1892, são publicados os trabalhos

de Miquel sobre cultura de diatomáceas.

Em 1898, Benecke pesquisa as necessidades de nutrientes minerais de algas em culturas unialgáceas (de uma só espécie de alga, mas não isentas de bactérias). É o primeiro a aconselhar o emprego de água destilada no preparo de meios de cultura para algas.

Chodat & Grintzesco (1900), Grintzesco (1902, 1903) e Chodat (1913, 1929) descrevem métodos para a obtenção de culturas puras de algas, além de acompanharem algumas mutações que ocorrem ocasionalmente nas espécies mantidas em laboratório.

Richter (1903) emprega os métodos de Miquel (1892) em estudos de fisiologia de diatomáceas.

Moore (1903) faz um levantamento histórico sobre os métodos de cultivo de algas até sua época.

Chick (1903) consegue culturas puras de Chlorella pyrenoidosa Chick, proveniente de águas ricas em bactérias, e realiza trabalhos sobre fisiologia desta alga no que se refere ao efeito da glicose e do nitrogênio (sob várias formas) no seu desenvolvimento.

Em 1912, Pringsheim publica o primeiro de uma série de trabalhos sobre cultura de algas (Pringsheim, 1912, 1914, 1918, 1919), tornando-se um dos primeiros pesquisadores a introduzir o uso de extrato de solo em seus meios.

Schramm (1914) relata os métodos de cultivo de algas em geral, bem como para algumas espécies em particular.

Meier (1932) faz um breve relato histórico sobre o cultivo de algas.

Chu (1942, 1943) fornece métodos e meios de cultura sintéticos para o cultivo de algas, bem como estuda a influência da variação da composição do meio no desenvolvimento destes organismos.

Rodhe (1948) faz observações sobre o fato de serem, em ambiente natural, as necessidades de fósforo por parte da diatomácea Asterionella formosa Hassall bem menores do que em meios sintéticos.

Gerloff et al. (1950a, 1950b, 1950c, 1952) tratam de processos de isolamento e cultura de Microcystis aeruginosa (Kützting) Elenkin e Coccochloris peniocyctis (Kützting) Drouet & Daily. Utilizam o meio de Chu nº 10, ao qual acrescentam algumas modificações.

Palmer (1952) publica um trabalho descrevendo uma câmara de cultura para o desenvolvimento de algas.

Em 1955, Kratz e Myers relatam o cultivo de Anabaena variabilis Kützting, Anacystis nidulans Gardner e Nostoc muscorum C. Agardh em tubos mantidos em banho-maria entre 25°C e 39°C, iluminados por lâmpadas fluorescentes e avaliam os resultados com auxílio de um turbidímetro.

Gerloff e Skoog (1957) publicam um trabalho sobre a influência do teor de nitrogênio no desenvolvimento de culturas de Microcystis aeruginosa (Kützting) Elenkin.

Allen (1963) publica uma lista de culturas mantidas no Laboratório de Biologia Comparada do Instituto da Fundação Kaiser.

O cultivo de algas "in situ" (ou seja, no local onde ocorrem), aconselhado por Fogg (1965), tem sido tentado por vários autores, entre os quais pode-se destacar os seguintes: Fitzgerald et al. (1952), Stepanek et al. (1960), Welch et al. (1972), Smith (1975), etc.

Medsker et al. (1968) desenvolvem um meio de cultura para as cianofíceas Symploca muscorum (C. Agardh) Gomont e Oscillatoria tenuis C. Agardh, ambas produtoras de odor semelhante ao produzido por actinomicetos.

Em 1969 é publicado o Procedimento Tentativo de Ensaio com Algas (P.A.A.P. - "Provisional Algal Assay Procedure") que descreve três procedimentos fundamentais no cultivo de algas, quais sejam: a cultura em frascos ("Bottle-test"); a de fluxo contínuo ("Continuous flow chemostat test") e o teste "in situ". Este trabalho, realizado por uma equipe de cientistas com experiência no cultivo de algas, é patrocinado pelo Programa Nacional de Pesquisas sobre Eutrofização dos Estados Unidos ("National Eutrophication Research Program") numa tentativa de padronizar métodos de cultivo a fim de facilitar a comparação de resultados.

Logo após esta publicação, um grupo de laboratórios inicia um programa de pesquisas com a finalidade de avaliar tais procedimentos, que culmina com a publicação do Processo de Ensaio com Algas: Culturas em Frascos (A.A.P. - "Algal Assay Procedure: Bottle-test") em 1971. Este método destina-se a identificação de nutrientes limitantes, determinação através de bioensaios de sua disponibilidade em vários ambientes, bem como avaliação da resposta biológica às mudanças de concentração de tais fatores.

Estas determinações são geralmente realizadas com algas que se desenvolvem bem nos meios sintéticos recomendados no método (A.A.M. - "Algal Assay Media"): Selenastrum capricornutum Printz, Anabaena flos-aquae (Lyngb.) De Brébisson e Microcystis aeruginosa (Kützinger) Elenkin. Estas espécies são cultivadas nas águas a serem testadas previamente esterilizadas em autoclave ou previamente filtradas em membrana, assim como em meio sintético.

Este procedimento padronizado é empregado por vários autores em pesquisas sobre produtividade, influência do teor de nutrientes, bem como sobre o efeito de despejos domésticos, agrícolas e industriais (alguns dos quais contendo metais pesados), em corpos de água receptores (Maloney et al., 1972; Miller et al., 1974; Maloney & Miller, 1975a; Shiroyama et al., 1975a, 1975b; Payne, 1975; Greene et al., 1975a, 1975b; Katko, 1975; Gerhold, 1975; Greene et al., 1976a, 1976b).

Goldman (1972a) discute quatro métodos para determinar o papel de micronutrientes em ambientes oligo e eutróficos.

Reynolds et al., (1975) fazem comparação entre os métodos de cultura de fluxo semi-contínuo e contínuo (Fogg, 1965; Porcella et al., 1970; Toerien et al., 1971; Goldman, 1972b) numa pesquisa sobre o efeito do fenol em Selenastrum capricornutum Printz.

Gerloff & Fitzgerald (1976) relatam a obtenção de culturas unialgáceas de Cladophora glomerata (L.) Kützinger com a finalidade de avaliar suas necessidades de nutrientes.

Miller (1976) e Jensen & Sicko Goad (1976) relatam os efeitos da carência de fósforo sobre a cianofícea Plectonema bonyanum Gomont.

1.3.2. SINOPSE E CONSIDERAÇÕES SOBRE TESTES DE TOXICIDADE

O principal objetivo dos testes de toxicidade é conhecer a ação deletéria de um agente químico num determinado grupo de organismos.

Um dos procedimentos mais comumente empregados para este fim é selecionar o meio de cultura ao qual se adicionam diversas concentrações do agente químico a ser testado, quando as algas atingem o estágio reprodutivo (Fitzgerald et al., 1952). Quando os organismos a serem testados se desenvolvem facilmente, convém manter culturas-estoque das quais se replica para meios contendo concentrações conhecidas do tóxico (Fitzgerald, 1960).

O número de indivíduos presentes nas culturas também deve ser constante de teste para teste. Fitzgerald (1964b, 1967) demonstra que a quantidade de algicida necessária para inibir o desenvolvimento de algas depende da quantidade de indivíduos presentes. Assim, quando o número de indivíduos de Chlorella pyrenoidosa Chick é aumentado de 150.000 para 900.000 células/ml, a concentração de Algimycin MT-4 (um composto orgânico de mercúrio) necessária para impedir o crescimento varia de 0,5 para 3 mg/l.

Quanto à concentração de células em relação à quantidade de meio, parece ser de importância secundária, analogamente ao que ocorre com bactérias (Fitzgerald & Der Vastanian, 1967, 1969).

Deste modo, quando a mesma quantidade de células de Chlorella pyrenoidosa Chick é dispersa em volumes diferentes de meio (de 25 a 250 ml), a quantidade de solução-estoque de um composto quaternário de amônio (D.A.C.- Cloreto de dodecilacetamidodimetilbenzilamônio) empregado para impedir o crescimento desta clorofícea varia apenas de 1 ml para 1,5 ml (Fitzgerald, 1964b).

É importante que as culturas utilizadas nos testes sejam bem desenvolvidas para que se tenha uma idéia do efeito real do agente tóxico. Segundo Fitzgerald(1971), para cada espécie de alga considerada há uma quantidade de inóculo adequada para que se consiga o desenvolvimento de sejado. O mesmo autor recomenda, no caso de cianofíceas planctônicas produtoras de floração, inóculos de aproximadamente 1,5 milhões de células/ml.

A composição química do meio também pode interferir com a ação do algicida. Deste modo, a cianofícea Phormidium inundatum Kützting apresenta maior resistência ao sulfato de cobre no meio alcalino de Gorham (Hughes et al., 1958) do que no meio neutro de Allen (Fitzgerald & Faust, 1964).

Os próprios agentes quelantes, destinados a manter em solução componentes do meio, podem interferir na eficiência de um agente tóxico.

O ácido cítrico foi, por exemplo, introduzido por Gerloff et al. (1950) para manter o ferro em solução. Este composto impede a precipitação do cobre, sem perda de suas propriedades algicidas (Fitzgerald, 1960; Fitzgerald & Faust, 1963a), ou seja, 1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

(Sulfato de cobre pentahidratado) é suficiente para impedir o desenvolvimento de Chlorococcum sp. quer o cobre apresente 8% ou 78% de solubilidade.

Por outro lado, 0,5 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre pentahidratado) em ambos os casos mostra-se ineficiente.

Entretanto, com relação a peixes, observa-se que a presença de ácido cítrico diminui a ação tóxica do cobre. Estes animais podem suportar até 500 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) em presença de 1000 mg/l de ácido cítrico sem morrer, em 24 horas, enquanto cerca de 0,5 mg/l deste agente químico mata 50% dos peixes, em 24 horas, na ausência de ácido cítrico. Deste modo, em águas alcalinas, a presença de ácido cítrico é benéfica pois permite manter a solubilidade do cobre sem afetar suas propriedades como algicida, mas protegendo os peixes (Fitzgerald, 1963).

Os ácidos orgânicos poli-amido-carboxílicos como, por exemplo, o E.D.T.A. (ácido etilenodiaminotetracético), também empregados como agentes quelantes em vários meios (como os de Stewart e Gorham), parecem diminuir o efeito algicida do $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre pentahidratado) Fitzgerald, 1971).

Os extratos de solo, também empregados em vários meios de cultura de algas (Stanr, Matulova, Gorham), parecem ter feito análogo, reduzindo o poder algicida do sulfato de cobre (Schatz et al., 1964). Assim, cultivando a cianofícea Anabaena circinalis Rabenhorst em meios de Gorham sem E.D.T.A. (ácido etilenodiaminotetracético), na

presença de extrato de solo, observa-se que são necessárias concentrações de pelo menos 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre pentahidratado) para impedir seu crescimento, enquanto, na ausência de extrato de solo, 0,05 mg/l do mesmo agente químico são suficientes para a mesma atividade algistática (Riemer & Toth, 1970).

Este é, pois, mais um ponto a ser considerado na seleção dos meios, quando se pretende testar algicidas.

A absorção excessiva de um algicida que atue no metabolismo, também tem influência na eficiência do tóxico. Assim, por qualquer razão, se algumas células ficam fora do alcance do agente algicida as demais absorvem-no todo, de modo que as primeiras passam a se desenvolver como se o agente tóxico não estivesse presente.

Quando um agente químico provoca a morte das células fala-se em algicida mas, quando apenas as impede de se reproduzir fala-se em algistático.

Por isto, é importante determinar:

a) o tempo de contato que o agente necessita para reproduzir efeito tóxico nas algas;

b) se o efeito é algicida (não há novo crescimento após remoção do agente tóxico) ou algistático (após a remoção do agente há novo desenvolvimento da espécie em questão)

Para testar os efeitos algistáticos basta acrescentar às culturas doses crescentes do agente tóxico. Após a incubação verifica-se qual a menor concentração que impediu o crescimento.

Para avaliar o ação algicida, pode-se escolher entre variar a concentração do tóxico ou variar o tempo de contato com o organismo.

A figura 1 ilustra as relações entre o tempo de contato de um algicida com as algas e a concentração do referido agente.

De um modo geral, há um tempo de exposição e uma concentração mínimos para produzir efeito letal, isto é, há um tempo de exposição mínimo para que determinado tóxico produza efeito; do mesmo modo, há uma concentração mínima abaixo da qual o tóxico pode ser tolerado indefinidamente.

Para fins práticos, ambos fatores devem ser levados em conta para que se obtenha a aplicação mais econômica possível.

O tempo de contato varia na prática com a finalidade a que se destina a água (Bussy, 1949; Jung, 1954; Fitzgerald, 1960, 1962, 1963). Fitzgerald & Faust (1964) baseiam suas experiências com algicidas em piscinas no tempo de contato de quatro horas. Otto & Bartley (1966) ao trabalhar com canais de irrigação fixaram o tempo de contato em uma hora.

De um modo geral, transferem-se para meios estéreis culturas expostas ao tóxico por períodos de tempo variáveis. Em seguida, propiciam-se condições ótimas para o desenvolvimento da espécie em teste.

A quantidade de cultura transferida varia de 1 ml a 25 ml (Fitzgerald & Faust, 1936b, 1964; Ukeles,

Fig. 1 Esquema das relações entre tempo de contato e concentração de um agente algicida (Fitzgerald, 1971)

1962) até o total da amostra (Otto & Bartley, 1966).

Quanto à necessidade de um agente químico que anule a ação do algicida no meio de cultura para o qual se vão transferir as amostras, parece variar de acordo com o algicida empregado. Para alguns agentes, como os compostos quaternários de amônio e o 2.3.D.N.Q. (2.3. dicloranaftoquinona), parece não haver necessidade. As culturas novas crescem entre 10 minutos e 4 - 12 horas (Fitzgerald et al., 1952; Fitzgerald & Faust, 1936b). Entretanto, em alguns casos o cobre ou a prata levados às culturas novas impedem seu desenvolvimento, a menos que se acrescente E.D.T.A. (ácido etilenodiaminotetracético) ou ácido tioglicólico (Fitzgerald, 1967) ao meio. Otto & Bartley (1966) recomendam a lavagem das algas tratadas antes de serem transferidas.

A presença de halogênios também pode interferir na ação do algicida. Assim, os cloretos quase não interferem na ação algicida da prata, os brometos interferem em maior grau e os iodetos praticamente anulam seu efeito tóxico (Fitzgerald, 1971).

Águas duras, com elevado teor de sais, especialmente de cálcio, talvez por interferirem na permeabilidade da membrana (Skidmore, 1964), diminuem o efeito de compostos algicidas e bactericidas (Ridenour & Arbruster, 1948), bem como o efeito de tóxicos para peixes (Doudoroff & Katz, 1953; Mount, 1966; Branco, 1959, 1971).

Além disto, como demonstra Fogg (1962), cerca de 45% da matéria orgânica produzida pelas algas é de constituintes extracelulares (como por exemplo a mucilagem

de Phormidium retzii Gomont), que as protegem da ação de agentes tóxicos (Fitzgerald, 1959).

A própria formação de agregados densos de algas pode, como em Phormidium inundatum Kützinger, proteger as células centrais da ação de algicidas (Fitzgerald, 1959).

Os produtos orgânicos lançados à água pelas algas como, por exemplo, glutamylcysteinylglycine,¹ cisteína e outros compostos sulfidrílicos podem reagir com os metais pesados e quinonas produzindo compostos inativos como algicidas (Colwell & McCall, 1946; Phillips & Warshowsky, 1958; Boney et al., 1959; McNew, 1960; Owens & Blaak, 1960; Merrifield & Yang, 1965).

Por outro lado, algumas algas têm capacidade de desenvolver resistência a alguns tóxicos, como é o caso de certas linhagens de Lyngbya versicolor (Wartman) Gomont e Phormidium autumnale (C. Agardh) Gomont, que se tornam resistente ao C.M.U. (3 p. clorofenil 1.1. dimetiluréia). Normalmente, cerca de 1 a 4 mg/l deste composto são suficientes para exterminar algas (Fitzgerald, 1957; Maloney, 1958; Shilo, 1965; Bussy, 1969). Contudo, em linhagens de Lyngbya versicolor (Wartman) Gomont e Phormidium autumnale (C. Agardh) Gomont previamente expostas ao C.M.U. (3 p. clorofenil 1.1. dimetiluréia) são necessárias concentrações até acima de 50 mg/l para produzir efeito tóxico (Quadro 1).

---

¹ Este composto é referido como Glutathione nos trabalhos de língua inglesa.

QUADRO 1 - Comparação da resistência de algumas linhagens de cianofíceas ao C.M.U. (3.p.clorofenil 1.1.dimetiluréia) em meio de Allen (1952); concentração inicial de 300.000 células/ml (Fitzgerald, 1964b).

A L G A S	Concentração de C.M.U. para impedir o crescimento (mg/l)
<u>Lyngbya versicolor</u> (Wis.1090)	> 24
<u>Lyngbya versicolor</u> (Wis.1092)	> 50
<u>Lyngbya versicolor</u> (Wis.1034)	1
<u>Phormidium autumnale</u> (Wis.1091)	> 50
<u>Phormidium autumnale</u> (Wis.1054)	1

Cervenka et al., (1959) recomendam o uso de CA350 (300 µg/l de cobre e 50 µg/l de prata), testado por vários pesquisadores da Tchecoslováquia (Stepanek et al., 1960; Kocurova, 1966; Moravcova, 1967), baseando-se numa ação sinérgica dos dois compostos citados. Entretanto, Fitzgerald & Faust (1963b) trabalhando com Microcystis aeruginosa (Kützting) Elenkin (bastante sensível ao $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sulfato de cobre pentahidratado e ao AgNO_3 , nitrato de prata) e Chlorella pyrenoidosa Chick (resistente ao $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sulfato de cobre pentahidratado mas sensível ao AgNO_3 , nitrato de prata) não conseguiram demonstrar esta ação sinérgica. (Quadros 2 e 3).

A utilização desta mistura de algicidas seria justificável economicamente apenas para algas que fossem relativamente mais sensíveis à prata.

QUADRO 2 - Efeito da prata nas propriedades algistáticas do cobre sobre a cianofícea Microcystis aeruginosa (Wis.1036). Meio de Gorham sem E.D.T.A (ácido etileno diaminotetracético), 1000.000 células/ml (Fitzgerald & Faust, 1963b).

AGENTE TÓXICO	Intervalo de concentrações de sulfato de cobre necessário para impedir o crescimento (mg/l)
Sulfato de cobre	0,025 - 0,075
Nitrato de prata	0,025 - 0,075 (a)
Sulfato de cobre e Nitrato de prata (6:1)	0,025 - 0,075
Sulfato de cobre e Nitrato de prata(4:1)	0,025 - 0,075
Sulfato de cobre e Nitrato de prata (1:1)	0,025 - 0,075

(a) Concentração de nitrato de prata.

QUADRO 3 - Efeito do cobre nas propriedades algistáticas da prata sobre a clorofícea Chlorella pyrenoidosa (Wis.2005). Meio de Allen, 300.000 células/ml (Fitzgerald & Faust, 1963b).

AGENTE TÓXICO	Intervalo de concentrações de nitrato de prata necessário para impedir o crescimento (mg/l)
Nitrato de prata	0,05 - 0,10
Sulfato de cobre	1,0 - 2,0 (a)
Nitrato de prata e Sulfato de cobre (1:1)	0,075
Nitrato de prata e Sulfato de cobre (1:4)	0,075
Nitrato de prata e Sulfato de cobre (1:6)	0,05 - 0,075

(a) Concentração de sulfato de cobre.

Há que considerar ainda o que se convencionou chamar critérios de morte (Phillips & Warshowsky, 1958; Otto et al., 1960; Branco, 1971), ou seja, quando se considera uma célula morta ou, ainda quantas células mortas são necessárias para que um agente químico seja dito algicida.

Há, para tanto, alguns métodos mais sofisticados baseados em medidas de respiração, fotossíntese ou teor de clorofila nas algas. Entretanto, somente são aplicáveis a agentes químicos de ação imediata, que afetam rapidamente a respiração e a fotossíntese (Beddow et al., 1968; Phelps & Schlichting, 1968) ou o teor de clorofila (Price & Estrada, 1964; Zweig et al., 1968; Sikka & Pramer, 1968). Os equipamentos para tais testes são bastante sofisticados e demandam concentrações relativamente altas de algas.

Na prática, podemos avaliar o efeito de uma substância tóxica para algas através das modificações de caráter morfológico e fisiológico que causa como, por exemplo: parada de movimento nas formas móveis e modificações citoplasmáticas; além de redução do número de organismos por mililitro (Branco & Branco, 1958; Branco, 1971).

1.4. OBJETIVOS

Os objetivos principais do presente trabalho foram:

1.4.1. Proceder a um levantamento bibliográfico, que não pretende ser completo em virtude da abrangência do assunto,

bem como analisar a problemática do cultivo de algas, em especial cianofíceas, e dos testes de toxicidade de vários agentes empregados como algicidas.

1.4.2. Contribuir para o conhecimento mais aprofundado da técnica de obtenção e manutenção de culturas unialgáceas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, assim como de culturas mistas com predominância desta cianofícea, simulando a situação do ambiente natural, em condições variáveis e controladas de laboratório.

1.4.3. Descrever em especial o comportamento de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner em culturas unialgáceas e mistas expostas por períodos de tempo variáveis a 0,1 e 0,2 mg/l do algicida $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre pentahidratado), assim como o comportamento das demais algas presentes nas culturas mistas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas usadas no presente trabalho foram obtidas a partir de amostras colhidas com rede de plancton (padrão nº 25, malha de 0,064mm de abertura) no Viveiro dos Cisnes do Lago da Fundação Parque Zoológico, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo.

Foi utilizado meio de cultura de Chu nº 10 modificado por Gerloff (Gerloff et al., 1950a) com algumas alterações, como segue: usaram-se aqui concentrações tripla de nitrato de cálcio e dupla de citrato férrico e de ácido cítrico (Quadro 4).

QUADRO 4 - Meio de Chu modificado

Reagente	Concentração (g/l)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,12
K_2HPO_4	0,001
$\text{Mg}.\text{SO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,025
Na_2CO_3	0,02
Na_2SiO_3	0,025
Citrato férrico	0,006
Ácido cítrico	0,006

Para levar estas quantidades em 10 ml foram preparadas as seguintes soluções-estoque de 250 ml em água destilada:

Estoque 1 - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3g/250 ml
Estoque 2 - $\text{K}_2.\text{HPO}_4$	0,025g/250 ml
Estoque 3 - $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,625g/250 ml
Estoque 4 - $\text{Na}_2 \text{CO}_3$	0,50 g/250 ml
Estoque 5 - $\text{Na}_2 \text{SiO}_3$	0,625g/250 ml
Estoque 6 - Citrato férrico	0,150g/250 ml
Estoque 7 - Ácido cítrico	0,150g/250 ml

Para preparar dois litros de meio de cultura foram colocados 20 ml de cada solução-estoque, na ordem acima, completando-se o volume de 2000 ml com água destilada.

Porções de 100 ml do meio assim preparado foram colocadas em 20 frascos Erlenmeyer de 250 ml de capacidade. Estes frascos foram fechados com tampões de algodão hidrófobo e esterilizados em autoclave por 20 minutos.

Os meios foram posteriormente inoculados utilizando-se pipetas esterilizadas contendo 1 ml de amostra e incubados numa Câmara de Germinação modificada, marca FANEM, modelo 347-E, mantidos à temperatura de 25°C sob iluminação contínua fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes de 15 watts, luz do dia. Foram ainda adaptados vibradores mecânicos sob as bandejas da câmara para manter os frascos em contínua agitação.

Durante os meses de maio, junho, julho e agosto de 1977, semanalmente, as quatro culturas que apre-

sentavam maior número de conjuntos de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner foram repicadas cada uma para cinco frascos Erlenmeyer, de 250 ml, contendo 100 ml do meio anteriormente citado, esterilizado, que, em seguida, eram incubados nas condições já referidas. Deste modo, as culturas foram mantidas ininterruptamente por aproximadamente 120 dias.

Foram obtidas culturas unialgáceas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner e culturas em que havia predominância desta espécie embora também apresentassem representantes dos gêneros Coelastrum Nägeli in Kützting, Chlorella Beijerinck, Scenedesmus Meyen, Monoraphidium Komarková-Legnerová, Navicula Bory, Nitzschia Hassall, Synedra Ehrenberg e Chlamydomonas Ehrenberg.

A identificação dos gêneros e espécie citados foi realizada no Instituto de Botânica, da Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, em São Paulo, com o auxílio de um microscópio binocular com contraste-de-fase, marca Carl Zeiss Oberkochen, modelo G.F.L. Os desenhos e medidas (fig.2) foram feitos, respectivamente, através de Câmara-clara binocular e ocular micrometrada de tambor acoplados ao sistema óptico do microscópio. Na identificação dos gêneros de clorofíceas e diatomáceas foram seguidos os trabalhos de autores como: Bicudo & Bicudo (1970), Bourrelly (1966), Joly (1963), Komarková-Legnerová (1969), Patrick & Reimer (1966), Prescott (1962) e Smith (1950). A identificação da cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock Kirchner) foi feita de acordo com Geitler (1932) e concorda com Desikachary (1959) e Sant'Anna et al. (1978). Drouet & Daily (1956) e Cocke (1967) incluem esta espécie na

Fig. 2 - Gêneros de algas presentes nas culturas

1- Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner. 2- Coelastrum Nägeli in Kützing. 3- Chlorella Beijerinck. 4- Scenedesmus Meyen. 5- Monoraphidium Komarková-Legnerová. 6- Navicula Bory. 7- Nitzschia Hassali. 8- Synedra Ehrenberg. 9- Chlamydomonas Ehrenberg.

sinonímia de Anacystis cyanea Drouet & Daily.

Em virtude do limitado espaço na câmara de cultura, a aplicação de sulfato de cobre foi feita primeiro nas culturas mistas e depois nas unialgáceas. Estas últimas foram mantidas através de repicagens semanais, enquanto se observou o efeito do sulfato de cobre nas culturas mistas.

Para a aplicação do sulfato de cobre, as quatro culturas mistas que apresentavam maior número de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner foram repicadas para quatro frascos Erlenmeyer, de dois litros de capacidade, contendo 510 ml do meio anteriormente citado, os quais foram incubados nas condições já descritas.

Utilizando o mesmo critério de seleção (maior número de conjuntos), após uma semana foram escolhidas duas culturas. As demais foram desprezadas.

De cada cultura selecionada, parte foi repicada para um frasco Erlenmeyer, de 250 ml de capacidade, com 100 ml de meio, que foi então incubado da forma descrita para servir de controle. Delas, também foram retiradas amostras para exames ao microscópio. Ao restante de cada cultura foi adicionada uma solução de sulfato de cobre de modo a obter, respectivamente, concentrações finais de 0,1 e 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado), ou seja, 0,25 ml e 0,5 ml, respectivamente, da solução de sulfato de cobre. Para preparar esta solução de sulfato de cobre, preparou-se primeiro uma solução-estoque, a qual foi preparada dissolvendo 5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) em 250 ml de água deionizada, o

que corresponde à concentração de 20 mg/l. Desta solução -estoque foram retirados 10 ml e completou-se o volume de 1 litro com água deionizada, obtendo-se, então, uma solução de 200 mg/l (ou 0,1 mg/0,5ml).

Após a aplicação do algicida, foram a cada 30 minutos, durante 12 horas, feitas repicagens destas culturas para frascos Erlenmeyer, de 250 ml, contendo 100 ml do meio citado. Todos os frascos foram incubados nas mesmas condições anteriormente citadas.

Depois de uma semana foram realizados exames ao microscópio das culturas resultantes. As contagens foram feitas utilizando-se a câmara de Sedgwick-Rafter, com o auxílio de um microscópio binocular marca Nikon, modelo S.U, no Departamento de Saúde Ambiental, da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo.

A contagem de algas foi realizada com objetiva de 10x.e ocular de 6x.

O método usado foi o de campo contínuo e contagem por conjuntos ("clump-counting"), entendendo-se por "conjuntos" a unidade característica do gênero, isto é, uma célula no caso de seres unicelulares livres, uma colônia no caso de seres unicelulares coloniais, um filamento no caso de algas filamentosas, etc (Branco, 1971). Para a contagem de indivíduos da espécie Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, cujas colônias apresentam forma irregular e tamanho extremamente variável, considerou-se "conjunto" uma colônia de 1440 μm^2 de área, ou seja, a área delimitada por um quadrado do micrômetro de Whipple (objetiva de 10x).

Os resultados das contagens foram multiplicados pelo fator 10, que corresponde ao número de campos contínuos contidos na câmara com o aumento usado (60 vezes).

Procedeu-se de maneira análoga com as culturas unialgáceas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner.

Em meados de setembro de 1977 procedeu-se a nova coleta de material do Viveiro dos Cisnes do Lago da Fundação Parque Zoológico. Este material foi inoculado em 20 frascos Erlenmeyer, de 250 ml de capacidade, contendo 100 ml do meio descrito, com a finalidade de repetir a experiência. Através de repicagens semanais foram, da maneira já descrita, obtidas culturas mistas em que havia predominância de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner. Estas culturas foram submetidas a ação do sulfato de cobre de forma análoga à descrita anteriormente.

3. RESULTADOS

A ação algicida do sulfato de cobre sobre as culturas obtidas está representada nos quadros 5 - 10. Os resultados expressos nos referidos quadros mostram o número de conjuntos por mililitro observados em culturas de uma semana de idade, que foram obtidas por repicagem de culturas expostas a duas concentrações do algicida (0,1 mg/l e 0,2 mg/l), por períodos de tempo variáveis. Os quadros 5 - 8 referem-se a culturas mistas com predominância de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner e os 9 e 10 a culturas unialgáceas desta cianofícea.

QUADRO 5 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

GÊNERO	Cultura Inicial	Contro- le	Culturas de 1 semana de idade provenientes da replicagem da										cultura inicial após exposição a 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.													
			Tempo de Exposição																							
			0:30h	1:00h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h	12:00h
<u>Microcystis</u>	630	680	220	400	40	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Coelastrum</u>	470	510	700	650	930	1370	270	220	380	910	600	700	630	680	390	290	270	130	120	140	370	410	390	340	280	260
<u>Scenedesmus</u>	130	160	290	260	290	420	50	10	20	30	20	60	30	60	60	40	60	20	30	80	160	180	170	50	40	60
<u>Chlorella</u>	20	40	80	50	370	640	170	80	70	140	30	50	30	50	70	100	30	60	50	220	540	600	400	40	50	40
<u>Monoraphidium</u>	120	10	1070	1000	1700	3600	1900	1800	1510	1800	1800	1800	1700	1100	1200	700	910	820	700	600	400	370	740	1400	1400	1600
<u>Navicula</u>	180	220	80	150	130	130	160	50	230	90	20	20	30	-	-	60	40	-	30	140	130	300	500	210	160	120
<u>Nitzschia</u>	280	250	170	140	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Synedra</u>	10	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Chlamydomonas</u>	10	10	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

QUADRO 6 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

GÊNERO	Cultura Inicial	Controle	Culturas de uma semana de idade provenientes da replicagem										da cultura inicial após exposição de 0,2 mg/l de CuSO ₄ .5H ₂ O.														
			Tempo de Exposição		0:30h	1:00h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h
<u>Microcystia</u>	620	730	240	200	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Coelastrum</u>	490	530	730	610	430	1140	230	550	480	820	520	680	560	570	490	210	250	150	150	100	270	280	250	460	210	290	290
<u>Scenedesmus</u>	150	180	360	340	580	270	220	10	10	20	30	10	40	60	40	70	20	10	50	60	140	110	100	70	70	120	120
<u>Chlorella</u>	10	30	70	40	290	80	40	70	60	80	40	20	40	60	30	90	40	60	80	170	720	460	510	110	130	140	140
<u>Monoraphidium</u>	100	20	930	1680	3900	5400	2100	1810	1310	1500	1400	1700	1400	1080	1010	1300	800	790	680	700	1320	1240	1230	2100	2200	2100	2100
<u>Navicula</u>	160	190	300	110	10	60	80	110	160	130	20	-	80	20	20	10	30	90	20	-	30	100	200	140	180	230	230
<u>Nitzschia</u>	180	280	50	80	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Chlamydomonas</u>	18	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

QUADRO 7 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

GÊNERO	Cultura Inicial	Controle	Culturas de uma semana de idade provenientes da repicagem											da cultura inicial após exposição a 0,1 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.												
			Tempo de Exposição		0:30h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h
<u>Microcystia</u>	620	640	120	120	20	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Coelastrum</u>	430	460	720	630	940	1040	600	400	560	500	480	380	380	450	360	320	350	320	630	900	920	880	740	680	630	390
<u>Scenedesmus</u>	480	450	300	340	280	400	100	20	30	30	20	20	20	120	-	-	20	-	20	30	30	20	10	-	10	-
<u>Chlorella</u>	70	80	70	50	920	580	480	100	260	200	180	180	60	120	100	80	100	80	150	170	190	160	140	120	90	80
<u>Monoraphidium</u>	20	-	1000	900	1500	1320	2200	3110	3010	3020	2820	3710	3710	2310	2030	1610	1830	1250	830	750	660	680	580	500	400	300
<u>Navicula</u>	280	430	760	90	103	120	90	30	80	50	60	80	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Nitzschia</u>	220	350	180	140	200	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

QUADRO 8 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

GÊNERO	Cultura Inicial	Controle	Culturas de 1 semana de idade provenientes da repicagem										da cultura inicial após exposição a 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.														
			Tempo de Exposição		0:30h	1:00h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h
<u>Microcystis</u>	630	630	80	80	20	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Coelastrum</u>	400	480	740	610	1200	2500	430	850	870	680	390	360	420	430	320	330	340	300	750	820	800	780	720	650	600	420	
<u>Scenedesmus</u>	460	480	350	270	760	360	200	90	100	40	30	20	10	-	-	10	30	10	20	20	20	10	-	-	-	-	
<u>Chlorella</u>	80	100	80	30	650	600	40	60	100	130	150	120	120	110	90	70	120	90	130	130	150	150	140	100	90	70	
<u>Monoraphidium</u>	-	10	1600	1200	3500	1630	2800	5820	6100	5910	3280	3820	3420	2530	2350	1820	1750	1520	1350	1330	1210	1010	980	800	700	600	
<u>Navicula</u>	270	400	280	200	200	500	80	70	90	60	50	60	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	
<u>Nitzschia</u>	350	380	30	50	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>Synedra</u>	50	60	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TADRO 9 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ESPÉCIE	Cultura Inicial	Controle	Tempo de Exposição	Culturas de uma semana de idade provenientes de repicagem da cultura inicial após exposição a 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.																							
			0:30h	1:00h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h	12:00h	
<u>Microcystis flo-</u> <u>scua</u>	10100	10410	5860	1029	63	160	150	270	280	180	150	190	130	120	70	80	60	40	10	-	-	-	-	-	-	-	

QUADRO 10 - Número de conjuntos por mililitro antes e após a aplicação de 0,2 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ESPÉCIE	Cultura Inicial	Controle	Culturas de 1 semana de idade provenientes da repicagem																								da cultura inicial após exposição a 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.											
			Tempo de Exposição																																			
			0:30h	1:00h	1:30h	2:00h	2:30h	3:00h	3:30h	4:00h	4:30h	5:00h	5:30h	6:00h	6:30h	7:00h	7:30h	8:00h	8:30h	9:00h	9:30h	10:00h	10:30h	11:00h	11:30h	12:00h												
<u>Microcystis floe-aqua</u>	10640	11330	4020	980	410	170	110	240	270	250	150	60	60	120	50	60	70	20	-	-	-	-	-	-	-	-												

4. D I S C U S S Ã O

O organismo selecionado para os testes foi Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, a despeito das dificuldades de cultivo que apresenta, por tratar-se de uma espécie que freqüentemente causa problemas em águas destinadas ao abastecimento e recreação.

Não obstante as amostras tenham sido colhidas em local que permanentemente apresenta uma extensa "floração" desta espécie, encontrou-se muita dificuldade em selecionar um meio de cultura que propiciasse seu desenvolvimento adequado em condições de laboratório.

A tentativa de cultivo na própria água do Lago da Fundação Parque Zoológico, passada sucessivamente em papel de filtro, papel de filtro e algodão, e membrana miliporo resultou numa comunidade heterogênea de algas, com predominância de clorofíceas.

Em várias culturas mal sucedidas foi possível observar, após a morte do Microcystis flos-aquae

(Wittrock) Kirchner, extenso desenvolvimento da diatomácea Nitzschia sp. na mucilagem das colônias da cianofíceia, analogamente ao que já havia sido observado "in natura" por Burgis et al. (1973) no Lago George, Uganda. Neste lago, a diatomácea Nitzschia microcephala Grunow utiliza a mucilagem de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner como suporte para manter-se na zona iluminada.

Segundo Fogg (1965), o insucesso do cultivo de algas em água proveniente do próprio local onde elas ocorrem é decorrente do fato da concentração de alguns micronutrientes depender de um equilíbrio dinâmico que é alterado quando a água é coletada. Afirma, ainda, que o próprio fato do cultivo ser realizado em ambiente limitado (frascos Erlenmeyer, tubos de ensaio, etc) já contribui para que haja diferenças de comportamento ligadas à relação superfície-volume do líquido.

Dentre os vários meios de cultura testados, o que melhores resultados propiciou foi o meio de Chu nº 10 modificado por Gerloff e com algumas alterações nossas. O quadro 11 mostra a comparação entre a composição deste meio e a da água de um lago eutrófico Kettle Mere Fogg (1965).

Os melhores resultados (desenvolvimento de maior número de conjuntos de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner/ml) foram conseguidos quando o teor de nitrato de cálcio foi triplicado e os de citrato férrico e de ácido cítrico, duplicados. O ácido cítrico tem ação quelante sobre o citrato férrico, facilitando sua dissolução além de, ao contrário de outros agentes quelantes, não apresentar nenhum efeito sobre a eficiência do sulfato de cobre como algicida (Fitzgerald, 1960; Fitzgerald & Faust, 1963a).

QUADRO 11 - Comparação entre a composição de um lago eutrofizado e a do meio de Chu nº 10 modificado por Gerloff (Fogg, 1965).

	Kettle Mere Shropshire England (mg/l) (Gorham, 1957)	Meio de Chu nº 10 modificado por Gerloff (mg/l)
Na	7,6	18,1
K	8,6	4,5
Ca	23,2	9,7
Mg	2,9	2,5
HCO ₃	34,8	23,0
Cl	13,9	-
SO ₄	26,8	9,7
NO ₃ - N	0,05	6,8
PO ₄ - P	0,004	1,8
SiO ₂	1,0	12,3
Fe	-	0,18

As culturas testadas foram mantidas em agitação contínua porque esta também constitui-se fator importante para o bom desenvolvimento de algas em laboratório. A turbulência permite melhor contato das células com os nutrientes, além de mantê-las em suspensão (Eberly, 1967).

Na verdade, algumas espécies são bastante exigentes quanto à turbulência, como demonstram Fogg & Than Tun (1960) para a cianofícea Anabaena cylindrica Lemm, ao verificar que o crescimento desta espécie é duplicado quando as culturas passam de 65 a 90 oscilações por minuto, mas é inteiramente inibido além de 140 oscilações por minuto.

A obtenção de culturas puras ou axênicas de algas constitui uma tarefa difícil e nem sempre desejável pois, os resultados obtidos em culturas puras nem sempre são aplicáveis às condições naturais, quando a alga encontra-se sujeita à ação de outras algas, bem como de outros organismos.

É fato comprovado experimentalmente a existência de interações entre os diversos seres vivos que pro voam um ambiente. Já em 1917, Hander demonstrava que a cianofícea Nostoc punctiforme (Kützting) Harriot produzia certas substâncias que diminuíam sua própria taxa de reprodução. Akehurst (1931) afirma que a água habitada por algas apresenta produtos de excreção que atuam favorecendo ou inibindo o desenvolvimento de outras algas. Lefèvre (1932, 1937), trabalhando com culturas clônicas, observa que os agentes auto-limitantes produzidos por algas atuam também sobre bactérias. Mast & Pace (1938) relatam o fenômeno de auto-inibição em culturas de Chilomonas paramecium Ehrenberg. Pratt & Fong (1940) e Pratt (1942, 1943, 1944, 1945)

relacionam os efeitos da clorelina produzida em culturas de Chlorella vulgaris Beijerinck sobre bactérias. Flint & Moreland (1946), Lefèvre & Nisbet (1948), Lefèvre & Jakob (1949) e Lefèvre et al. (1950, 1952) estudam "in vitro" o efeito de substâncias liberadas por algas sobre outras algas.

Vários autores, dentre os quais Klosa (1949) e Spoehr et al. (1949) demonstraram "in vitro" o efeito bactericida e bacteriostático de certas algas.

Kain & Fogg (1958) observaram que a diatomácea Asterionella japonica Cleve desenvolve-se bem em culturas que apresentam bactérias, mas não em culturas isentas destes organismos, mesmo quando o meio é enriquecido por diversos fatores de crescimento.

A liberação de substâncias ativas por algas constitui pois um fato comprovado. Na verdade, segundo Lefèvre (1968), o desenvolvimento de algas em meios sintéticos cessa muito antes da exaustão de nutrientes, como pode ser comprovado através de análises químicas efetuadas. Este fato é atribuído a um processo de auto intoxicação ou autoantagonismo (Lefèvre et al., 1952). Em culturas de laboratório, Lefèvre (1968) mostrou através de titulação com KMnO_4 (permanganato de potássio) presença no meio de cerca de 50 a 60 mg/l de compostos orgânicos. Verificou também que a introdução de água bidestilada ao meio, por causar uma diluição das substâncias inibidoras, leva a novo desenvolvimento da cultura. Em meio sólido obteve o mesmo resultado com a lavagem da cultura com água bidestilada.

Lefèvre & Nisbet (1948), Lefèvre & Jakob (1949) e Lefèvre et al. (1950, 1952) estudam "in vitro" o

efeito heteroantagônico (antagonismo entre espécies diferentes) de algas colocando gotas de uma cultura sobre outra. Relatam três tipos de situação diferentes:

a) Inibição da reprodução, enquanto a assimilação permanece normal, isto é, os organismos acumulam reservas em excesso, tornam-se hipertróficos e acabam por romper a membrana.

b) Inibição da assimilação, enquanto a reprodução permanece normal, isto é, os organismos dividem-se às expensas de suas reservas, tornam-se mais fracos e acabam morrendo quando estas reservas se esgotam.

c) Inibição simultânea da reprodução e da assimilação, isto é, a morte sobrevém rapidamente.

Esses autores acreditam que as substâncias liberadas pelas algas podem ser tanto nocivas como favoráveis para outras algas. Lefèvre (1968) acredita que o efeito final seja decorrente da predominância de umas sobre as outras.

Muitas destas substâncias produzidas por algas são termolábeis ou podem ser adsorvidas por carvão ativado. Deste modo, águas naturais que contenham tais substâncias, após aquecimento ou tratamento com carvão ativado podem tornar-se capazes de propiciar o desenvolvimento das espécies previamente inibidas (Lefèvre, 1968).

Considerando todas estas interações, Fogg (1965) chega a recomendar que os pesquisadores se ocupem de culturas que contenham mais de uma espécie.

No presente trabalho foram utilizadas culturas unialgáceas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner além de culturas que apresentaram coexistência de vários gêneros de algas, mas com acentuada predominância da espécie Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, analogamente ao que ocorre no ambiente natural e de onde foram realizadas as coletas.

Embora seja possível manter em laboratório a temperatura relativamente constante, do mesmo modo como ocorre nas grandes massas de água, a iluminação a que se encontram expostas as algas é extremamente difícil de ser imitada. O clima de luz que envolve as algas no ambiente natural depende de fatores tais como: profundidade, características próprias da água (cor, turbidez), bem como da época do ano e de fatores meteorológicos. Em ambiente natural, as algas encontram-se expostas a uma alternância sucessiva de períodos de luz (dia) e escuro (noite), entretanto, em laboratório a maioria das espécies desenvolve-se melhor sob iluminação contínua. Tal fato pôde ser comprovado neste trabalho, pois a tentativa da cultivo em câmara de cultura ajustada para períodos de luz e escuro alternados produziu culturas com número bem menor de conjuntos de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner do que sob iluminação contínua. Por esta razão, preferiu-se a última alternativa.

Analogamente ao que foi observado por Gerloff et al. (1950), a obtenção de culturas bem desenvolvidas só foi possível a partir de sementeiras realizadas com pipetas graduadas. A tentativa de sementeira e repicagem utilizando-se alça de platina sempre produziram desenvolvimento de culturas mistas com predominância de clorofíceas.

Na natureza Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner produz extensas "florações". Nessas circunstâncias, outros organismos que normalmente habitam o corpo de água, tais como espécimes de Coelastrum Nägeli in Kützting, Scenedesmus Meyen e Monoraphidium Komarková-Legnerová, parecem extinguir-se. Entretanto não desaparecem completamente, permanecendo presentes sob formas de resistência.

O fenômeno da "floração" em águas completamente paradas, assim como em frascos de cultura, tende a ser transitório, pois a espécie geralmente desaparece com o tempo em consequência da autointoxicação causada por seus próprios produtos de excreção - autoantagonismo (Lefèvre et al., 1952).

Quando a água não se apresenta completamente parada mas é lenta e continuamente renovada, como ocorre no local onde foram realizadas as coletas de inóculos para este trabalho, a "floração" tende a perdurar em maior ou menor grau porque os produtos secretados pelas algas são constantemente removidos.

Quando uma espécie de alga predomina em águas paradas, observa-se que as demais aparecem esporadicamente. Foi o que se observou no Viveiro dos Cisnes da Fundação Parque Zoológico. Lefèvre et al. (1952) atribuem este fenômeno (heteroautagonismo) a substâncias antagônicas liberadas pela espécie dominante.

Lefèvre (1968) cita dois casos de heteroantagonismo em águas naturais. No primeiro caso, trata-se de uma "floração" de Aphanizomenon Morren quando, então, as

demais espécies quase chegam a desaparecer. À medida que a população de Aphanizomenon Morren diminui, as outras espécies multiplicam-se cada vez mais ativamente.

O segundo caso fala da água de uma fonte que alimenta um lago. A água da fonte apresentou elevado número de Cosmarium lundelli. Delponte, enquanto no lago desenvolvia-se em larga escala a cianofícea Oscillatoria planctonica Woloszyńska. Quando se inocula Cosmarium lundelli Delponte no filtrado do lago, as células desta cianofícea morrem rapidamente.

Os quadros 5 - 8 do presente trabalho, referentes à aplicação do algicida a culturas mistas com predominância de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner, mostram uma acentuada diminuição no número de conjuntos desta cianofícea. As culturas provenientes de repicagens feitas após três horas de contato com o algicida não mostraram desenvolvimento desta espécie.

As diatomáceas do gênero Navicula Bory não apresentaram grande variação numérica com o aumento do tempo de contato; entretanto as do gênero Nitzschia Hassall parecem ser ainda mais sensíveis que a cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner. O gênero Synedra Ehrenberg também parece ser bastante suscetível ao sulfato de cobre.

O flagelado clorofilado Chlamydomonas Ehrenberg, presente em número reduzido e apenas em parte das culturas (quadros 5 e 6), também demonstrou bastante sensibilidade ao algicida.

Representantes de clorofíceas dos gêneros

Coelastrum Nägeli in Kützting, Scenedesmus Meyen, Chlorella Beijerinck e Monoraphidium Komarková-Legnerová não demonstraram sofrer inibição pelo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) nas condições de concentração e tempo de contato do teste. Ao contrário, o número de conjuntos de representantes do gênero Monoraphidium Komarková-Legnerová sofreu acentuada elevação.

Na natureza, quando a espécie dominante no momento da "floração" desaparece, as demais tendem a multiplicar-se rapidamente. Na verdade, parece até que esta proliferação é favorecida pelos produtos de decomposição da referida espécie (Lefèvre, 1968).

A eliminação da competição, entretanto parece-nos ser a principal razão do rápido desenvolvimento das clorofíceas, em especial Monoraphidium Komarková-Legnerová, após a eliminação da cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner pela ação do sulfato de cobre (quadros 5 - 8).

Em culturas unialgáceas, (quadros 9 e 10) a cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner demonstrou maior resistência à ação algicida do sulfato de cobre. Esta maior resistência, observada nas culturas unialgáceas, em relação às culturas mistas poderia, ser atribuída à presença de substâncias produzidas pelas demais algas, presentes nas culturas mistas, que agiriam em sinérgismo com o algicida.

Outra causa para esta maior resistência, que poderia ser levada em consideração, seria o maior número de conjuntos de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner

existente nas culturas unialgáceas iniciais (quadros 9 e 10) em relação ao das culturas iniciais mistas (quadros 5 - 8) analogamente ao que foi observado por Fitzgerald (1964b) com relação à clorofícea Chlorella pyrenoidosa Chick e o algicida Algimycin MT.4 (composto orgânico de mercúrio). Conforme já foi mencionado anteriormente, quando o número de células de Chlorella pyrenoidosa Chick foi aumentado de 150 000/ml para 900 000/ml, a concentração de Algimycin MT.4 necessária para impedir o crescimento da referida espécie variou de 0,5 a 3 mg/l. Seria interessante repetir a experiência partindo de culturas iniciais (mistas e unialgáceas) com igual número de conjuntos de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner.

5. CONCLUSÕES

5.1. As culturas de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner foram possíveis a partir de inóculos colhidos com rede de plancton num lago que apresenta "floração" permanente desta espécie; semeadura e repicagem com pipeta em meio de Chu nº 10 modificado por Gerloff e apresentando concentração tripla de nitrato de cálcio e dupla de citrato férrico e de ácido cítrico; incubação em câmara de cultura regulada para manter a temperatura de 25°C, iluminação contínua e agitação.

5.2. Em culturas unialgáceas, a cianofícea Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner resistiu à ação algicida do sulfato de cobre por mais tempo do que em culturas mistas.

5.3. A aplicação de sulfato de cobre em culturas mistas com predominância de Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner

produziu a eliminação desta espécie e o incremento das populações de clorofíceas, especialmente de espécies do gênero Monoraphidium Komarková-Legnerová.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKEHURST, S.C., 1931. Observations on pond life, Jl.R.mi-crosc. Soc., London, 51: 237-265.
2. ALLEN, M.B., 1963. List of cultures maintained by the Laboratory of Comparative Biology. Kaiser Foundation Research Institute.
3. ALLEN, C.K., 1966. Use of cooper sulfate in water treatment. Wat. Sewage Wks, Chicago, 113: R71-72, R74-75.
4. AZEVEDO NETTO, J.M., 1966. Tratamento de águas de abastecimento. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 329 p.
5. BARTSCH, A.F., 1954. Practical methods for control of, algae and water weeds. Publ. Hlth. Rep., Washington, 69(8): 749-757.
6. BARTSCH, A.F., 1967. Proceedings of a Symposium Jointly-Sponsored by University of Washington & Federal Water Pollution Control Administration. U.S. Department of the Interior.
7. BEDDOW, D.G., SCHILICHTING, JR., H.E. & VANCE, B.D., 1968. The survival of some algae in highly chlorinated water. Adv. Front. Plant.Sci. New Delhi 19: 165-178.
8. BEIJERINCK, M.W., 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen Li-chengonidien und anderen niederen Algen, Bot. Ztg, Berlin & Leipzig, 48: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
9. BENECKE, W., 1898. Ueber Culturbedingungen einiger Algen. Bot. Ztg, Berlin & Leipzig, 56: 83-96.

10. BICUDO, C.E.M. & BICUDO, R.M.T. 1970. Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1-228 p. fig. 1-430.
11. BISHOP, T., Anet J. & GORHAM, R., 1959. Isolation and identification of fast-death factor in Microcystis aeruginosa NRC-1. Can. J. Biochem. Physiol., Ottawa, 37: 453-471.
12. BOLD, H.C., 1942. The cultivation of algae. Bot. Rev., Lancaster, 8: 69-134.
13. BONEY, A.D., CORNER, E.D.S. & SPARROW, B.W.P., 1959. The effects of various poisons on the growth and viability of sporelings of the red alga Plumaria elegans. Biochem. Pharmacol., Lonfon, New York, 2: 37-49.
14. BOURRELLY, P., 1966. Les algues d'eau douce: initiation à la systematique, 1: Les algues vertes, Paris: Editions N. Boubée & Cie. 512p.
15. BOURRELLY, P., 1970. Les algues d'eau douce: initiation à la systematique, 3: Les algues bleues et rouges, les Euglêniens, Peridiens et Cryptomonadines. Paris: Editions N: Boubée & Cie. 512p.
16. BOWSER, C., 1951. R.A.D.A. for algae. Reclam. Era, Washington, 37: 247-248.
17. BRANCO, S.M., 1959. Alguns aspectos da hidrobiologia sanitária importantes para a engenharia sanitária. Rev. D.A.E., São Paulo, 20 (33): 21-30 fig. 1-5, 20 (34): 29-42 fig. 6-9.

18. BRANCO, S.M., 1962. Controle preventivo e corretivo de algas em águas de abastecimento. Rev. D.A.E., São Paulo, 21 (45): 61-75.
19. BRANCO, S.M., 1971. Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária. São Paulo: Centro Tecnológico de Saneamento Básico. Fomento Estadual de Saneamento Básico e Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. 3v. 124p.
20. BRANCO, S.M. & BRANCO, W.C., 1958. Processos para se verificar em laboratório o efeito de substâncias tóxicas sobre algas. Rev. D.A.E., São Paulo, 19 (32):93-95.
21. BRANCO, S.M. & PEREIRA, H.A.S.L., 1968. Características biológicas da água de piscinas. In: Piscinas de Uso Coletivo. São Paulo: Universidade de São Paulo, Organização Mundial de Saúde e Organização Panamericana de Saúde, 10p. fig. 1-28.
22. BURGIS, M.V., DARLINGTON, J.P.E.C., DUNN, I.G. GAUF. G.G., GUAHABA, J.J. & MCGOWAN, L.M., 1973. The biomass and distribution of organisms in Lake George, Uganda. Proc. R.Soc. London B., 184: 271-298.
23. BUITRON, J.L., MURSIN, K. & PARO, M.C., 1974. Noções básicas sobre o tratamento e o controle de qualidade da água. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo e Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. 84p.
24. BUSSY, I.J. de, 1949. Growth and control of algae in open-air swimming pools-Reports n° 1(sec.1): 1-78. In: Research Institute for Public Health Engineering T.N.O. Reports. Netherlands.

25. CARR, J.B., 1976. Stop algae with preventive medicine.
The Am. Cy. County, Wesllesley, 7:43-44.
26. CERVENKA, R., Stepanek, M. & Votavova, M., 1959 Limnological study of the reservoir Sedlick near Zeliv VII: a contribution to the technique of selecting new algicide compounds. Scien. Pap. Inst. Chem. Technol., Praha, 7(2): 175-263.
27. CHICK, H., 1903. A study of a unicellular alga occurring, in polluted water with special reference to its nitrogenous metabolism. Proc.R.Soc., London, 71:458-476.
28. CHODAT, R. 1913. Monographies d'algues en culture pure.
In: Mater pour la Flore Crypt. Suisse. 4, part2:1-266.
fig. 1-120.
29. CHODAT, R., 1929. La mutation généralisée et les mutations chez Chlorella rubescens Chod. Archs.Sci. phys. nat.
Genève, Lausanne, Paris, VII (suppt.): 31-38.
30. CHODAT, R. & GRINTZESCO, I., 1900. Sur les méthodes de culture pure des algues vertes. Act. Congr. int.Bot., Paris: 157-162.
31. CHU, S.P., 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae, I: Methods and culture media. J. Ecol., London, 30:284-325.
32. CHU, S.P., 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae, II: The influence of the concentration of inorganic nitrogen and Phosphate phosphorus. J.Ecol., London, 31:109-148.

33. COCKEE, E.G., 1967. The Myxophyceae of North Carolina.
Ann Arbor, Michigan: Ed. Edwards Brothers, Inc. ivii+1-
206p. fig.1-326.
34. COLWELL, C.A. & McCALL, M., 1946. The mechanism of bacte-
rial and fungus growth inhibition by 2-,ethyl-1.4-
-naphthoquinone. J.Bact.Baltimore, 51: 659-670.
35. DERBY, R.L. & TOWNSEND, F.W., 1953. Reservoir treatment
by improved methods. Wat. Sewage Wks., Chicago, 100(6):
211-216.
36. DESIKACHARY, T.V., 1959. Cyanophyta New Delhi: Indian
Council of Agricultural Research.i-x+1-686p. fig.1-139.
37. DOUDOROFF, P. & KATZ, M., 1953. Critical review of the li-
terature on the toxicity of industrial wastes and their
components to fish,II: the metals as salts.Sewage ind.
Wastes,Easton, 25: 802-839.
38. DROUET, F. & DAILY, W.A., 1956. Revision of the coccoid
Myxophyceae. Indianapolis: Butler Universities Botani-
cal Studies 12: 1-222, fig. 1-377.
39. EBERLY, W.R., 1967. Problems in the laboratory culture of
blue-green algae. In: Environmental requirements of
blue-green algae. Washington: Federal Water Pollution
Control Administration, Northwest Region and Universi-
ty of Washington: 7-34.
40. ELLMS, J.W., 1905. Bahaviour and uses of CuSO_4 in the pu-
rification of hard and turbid waters. J. New Engl.Wat.
Wks. Ass., New London 19: 496-503.

41. FITZGERALD, G.P., 1957. The control of the growth of algae with C.M.U., Wis. Acad. Sci., Arts Lett, Madison, 46: 281-294.
42. FITZGERALD, G.P., 1959. Bactericidal and algicidal properties of some algicides for swimming pools. Appl. Microbiol., Baltimore, 7(4): 205-201.
43. FITZGERALD, G.P., 1960. Loss of algicidal chemicals in swimming pools. Appl. Microbiol., Baltimore, 8(5):269-274.
44. FITZGERALD, G.P., 1962. Bioassay for algicidal chemicals in swimming pools. Wat. Sewage Wks., Chicago, 109:361-363.
45. FITZGERALD, G.P., 1963. Field test on the duration of algicides in swimming pools. J. environ. Hlth. Denver, 25:319-325.
46. FITZGERALD, G.P., 1964a. Laboratory evaluation of potassium permanganate as an algicide for water reservoirs. J.S.W. Wat. Wks. Ass., Baltimore, 45(10): 16-17.
47. FITZGERALD, G.P., 1964b. Factors in the testing and application of algicides. Appl. Microbiol., Baltimore, 12: 247-253.
48. FITZGERALD, G.P., 1964c. Evaluation of potassium permanganate as an algicide for water cooling towers. Ind. & Eng. Chem., Prod. Res. & Dev. Easton, 3:82-85.
49. FITZGERALD, G.P., 1966. Use of potassium permanganate for control of problem algae. J. Am. Wat. Wks. Ass., Baltimore, 58: 609-614.

50. FITZGERALD, G.P., 1967. The algistatic properties of silver. Wat. Sewage Wks., Chicago, 114: 185-189.
51. FITZGERALD, G.P., 1971. Algicides. Wisconsin: National Technical Information Service. 62p.
52. FITZGERALD, G.P., GERLOFF, G.C. & SKOOG, F., 1952. Studies on chemicals with selective toxicity to blue-green algae. Sewage ind. Wastes, Easton, 24: 888-896.
53. FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F., 1954. Control of blue-green algae blooms with 2,3-dichloronaphtoquinone. Sewage ind. Wastes, Easton, 26: 1136-1140.
54. FITZGERALD, G.P., & FAUST, S.L., 1963a. Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper. Appl. Microbiol., Baltimore, 11: 345-351.
55. FITZGERALD, G.P. & FAUST, S.L., 1963b. Bioassay for algicidal versus algistatic chemicals. Wat. Sewage Wks., Chicago, 110: 296-298.
56. FITZGERALD, G.P. & FAUST, S.L., 1964. Techniques for economical comparisons of swimming pool algicides. Swimm. Tech. Richmond, 5: 141-146.
57. FITZGERALD, G.P. & DERVARTANIAN, M.E., 1967. Factors influencing the effectiveness of swimming pool bactericides. Appl. Microbiol. Baltimore, 15: 504-509.
58. FITZGERALD, G.P., & DERVARTANIAN, M.E. 1969. Pseudomonas aeruginosa for the evaluation of swimming pool chlorination and algicides. Appl. Microbiol., Baltimore, 17: 414-421.

59. FOGG, G.E., 1962. Extracellular products. In: R.A.Lewin (ed) Physiology and Biochemistry of algae. New York:Academic Press, Inc.: 475-489.
60. FOGG, G.E., 1965. Algal cultures and phytoplankton ecology. Madison, Milwaukee and London: The University of Wisconsin Press.
61. FOTER, M.J., PALMER, C.M. & MALONEY, T.E., 1953. Antialgal properties of various antibiotics. Antibiot. and Chemother New York, 3(5): 505-507.
62. GEITLER, L., 1932. Cyanophyceae. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H.vi+1196p.,fig.1-780.
63. GERHOLD, R.M., 1975. Nutritional bioassays of Lake Wylie, North Caroline. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Proceedings. Logan: United States Environmental Protection Agency, Division of Environmental Engineering & Utah State University: 175-220.
64. GERLOFF, G.C., FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F., 1950a. The isolation, purification and culture of blue-green algae. Am.J.Bot., Lancaster, 37: 216-218.
65. GERLOFF, G.C., FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F., 1950b. The isolation, purification and nutrient solution requirements of blue-green algae. In: The Culturing of algae. Yellow Spring: The Charles F. Kettering Foundation.
66. GERLOFF, G.C., FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F., 1950c. The mineral nutrition of Coccochloris peniocyctis. Am.J. Bot. Lancaster, 37: 835-840.

67. GERLOFF, G.C., FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F., 1952. The mineral nutrition of Microcystis aeruginosa. Am.J. Bot., Lancaster, 39(1): 26-32.
68. GERLOFF, G.C. & SKOOG, F., 1957. Nitrogen as a limiting factor for the growth of Microcystis aeruginosa in southern Wisconsin lakes. Ecology, New York, 38:556-561.
69. GERLOFF, G.C. & FITZGERALD, G.P., 1976. The nutrition of Great Lakes Cladophora. Duluth: United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development & Environmental Research Laboratory. p. i-xi+1-110.fig.1-9.
70. GOLDMAN, C.R., 1972a. The role of minor nutrients in limiting the productivity of aquatic ecosystems. In: Nutrients and Eutrophication Special Symposia, 1:21-38.
71. GOLDMAN, J.C., 1972b. The kinetics of inorganic carbon-limited growth of green algae in continuous culture: it's relationships to eutrophication. (PhD. dissertation) Berkeley: University of California.
72. GORHAM, E., 1957. The chemical composition of some waters from lowlands in Shropshire, England. Tellus, Stockholm, 9:174-179.
73. GORHAM, P.R., 1964. Toxic algae as a public health hazard. J. Am. War. Wks. Ass. Baltimore, 56: 1488-1495.
74. GORHAM, P.R., McLACHLAN, J., HAMMER, U.T. & KIM, W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae Lyngb. Verh. Int. Verein. theor. angew. Limnol. Stuttgart, 15: 796-804.

75. GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T. & MALONEY, T. E., 1975a. Utilization of algal assays to assess the effects of municipal, industrial and agricultural wastewater effluents upon phytoplankton production in the Snake River System. Water Air Soil Pollut., Dordrecht, 4: 415-434.
76. GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T. & MERWIN, E., 1975b. Toxicity of zinc to the green alga Selenastrum capricornutum Printz as a function of phosphorus or ionic strength. In: Proceedings of Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop. Corvallis: Eutrophication and Lake Restoration Branch: 28-43.
77. GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T., SOLTERO, R.A. & PUTNAM, K., 1976a. Use of algal assays to assess the effects of municipal and smelter wastes upon phytoplankton production. In: Proceedings of the symposium on terrestrial and aquatic ecological studies of the northwest Cheeney: Eastern Washington State College. 13p.
78. GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T., SOLTERO, R.A. & PUTNAM, K., 1976b. Use of laboratory cultures of Selenastrum, Anabaena and the indigenous isolate Sphaerocystis to predict effects of nutrient and zinc interactions upon phytoplankton growth in Long Lake, Washington. In: Proceedings of International Symposium on Experimental Use of Algal Cultures in Limnology. Sandefjord, Norway.

79. GRINTZESCO, R., 1902. Recherches experimentales sur la morphologie et la physiologie de Scenedesmus acutus Meyen. Bull. Herb. Boissier., Genève & Bale, II 2: 217-264, 406-432.
80. GRINTZESCO, J., 1903. Contribution a l'etude des proto-coccales Chlorella vulgaris Beijerinck Revue.gen.Bot., Paris, 15: 1-19, 67-82.
81. HALE, F.E., 1957. The use of copper sulfate in control of microscopic organisms. New York: Phelps Dodge Refining Corporation. 44p.
82. HARDER, R., 1917. Ernhrungsphysiologisches Untersuchu gen an Cyanophyceen, hauptschlich dem endophytischen Nostoc punctiforme: Z.Bot., Jena, 9: 145-242.
83. HUGHES, E.O., GORHAM, P.R. & ZEHNDER, A., 1958. Toxicity of a unialgal culture of Microcystis aeruginosa. Can. J. Microbiol., Ottawa, 4: 225-236.
84. JENSEN, T.E. & SICKO-GOAD, L., 1976. Aspects of phosphate utilization by blue-green alga. Corvalis: Corvalis Environmental Research Laboratory.
85. JOLY, A.B., 1963. Gneros de algas de gua doce da cidade de So Paulo e arredores, Rickia, So Paulo, Supl.1: 1-188, fig.1-125.
86. JUNG, W., 1954. Algal growth and control in open air baths. Wat. Pollut. Abstr., London, 27: 2206-2209.
87. KAIN, J.M. & FOGG, G.E., 1958. Studies on the growth of marine phytoplankton, I. Asterionella japonica Gran. J.mar.biol.Ass. U.K., Phymouth, 37: 397-413.

88. KATKO, A., 1975. Algal assays for the national eutrophication survey. In: Proceedings of Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop. Corvallis: Eutrophication and Lake Restoration Branch: 44-52.
89. KEMP, H.T., FULLER, R.G. & DAVIDSON, R.S. 1966. Potassium permanganate as an algicide. J. Am. Wat. Wks., Baltimore, 58:255-263.
90. KLOSA, J., 1949. Ein neues Antibiotikum aus Grünalgen. Z. Naturf., Wiesbaden, Tübingen, 4B:187.
91. KOCUROVA, E., 1966. The application of algicide C.A.350 in the Lubi reservoir near Trebic, Czechoslovakia. Hydrobiologia, Den Haag, 28(2): 223-240.
92. KOMARKOVÁ-LEGNEROVÁ, J., 1969. The systematics and ontogenesis of the genera Ankistrodesmus Corda and Monoraphidium gen. nov. Praha: Stud. Phycol. 75-122 p.fig.1-22.
93. KRATZ, W.A., & MYERS, J., 1955. Nutrition and growth of several blue-green algae. Am. J. Bot. Lancaster, 42: 282-287.
94. KRAUSS, R.W., 1962. Inhibitors. In: Physiology and biochemistry of algae. New York: Academic Press, Inc.
95. LANGE, N.A., 1944. Handbook of chemistry. Sandusky: Handbook Publishers, Inc.
96. LEFÈVRE, M., 1932. Recherches sur la biologie et la systématique de quelques algues obtenues en cultures. Revue Algol., Paris, 6(3-4):313-338.
97. LEFÈVRE, M., 1937. Techniques de culture cloniques de Desmidiées. Ann. Sci. nat. Bot., Paris, Ser. 10, 19.

98. LEFÈVRE, M., 1968. Extracellular products of algae. In:
Algae, Man and Environment. Syracuse: Syracuse University Press.
99. LEFÈVRE, M. & NISBET, M., 1948. Sur la sécrétion par certaines espèces d'algues, de substances inhibitrices d'autres espèces d'algues. C.r.hebd. Séanc.Acad.Sci., Paris, 226: 107-109.
100. LEFÈVRE, M. & JAKOB, H., 1949. Sur quelques propriétés des substances actives tirées des cultures d'algues d'eau douce. C.r.hebd. Séanc.Acad.Sci., Paris., 229: 234-236.
101. LEFÈVRE, M., NISBET, M. & JAKOB, H., 1949. Action des substances excretées en culture par certaines espèces d'algues sur le métabolisme d'autres espèces d'algues. Verh.int. Verein. theor. angew. Limnol., Stuttgart, 10:259-264.
102. LEFÈVRE, M., JAKOB, H. & NUSBET, M., 1950. Sur la sécrétion par certaines Cyanophytes de substances algostatiques dans les collections d'eau naturelles. C.r.hebd. Séanc. Acad.Sci., Paris, 230: 2226-2227.
103. LEFÈVRE, M., JAKOB, H. & NISBET, M. 1951. Compatibilités et antagonismes entre algues d'eau douce dans les collections d'eau naturelles. Trav. Assoc.internat. de Limnol. théoret. et appl., Paris, 11:224-229.
104. LEFÈVRE, M., JAKOB, H. & NISBET, M., 1952. Auto et hétéro-antagonisme chez les algues d'eau douce in vitro et dans les collections d'eau naturelles. Annls. Stn. cent.Hydrobiol. appl., Paris, 4: 5-198.

105. MACKENTHUN, K.M., 1958. A report on the use of chemicals on lakes, ponds and streams for the control of algae, weeds and other aquatic nuisances. Wisconsin: Comitee on Water Pollution.
106. MACKENTHUN, K.M., 1969. The practice of water pollution biology. Washington, D.C.: Federal Water Pollution Control Association.
107. MACKENTHUN, K.M. & INGRAN, W.M., 1964. Limnological aspects of recreational lakes. Washington, D.C.: United States Department of Health, Education and Welfare.
108. MALONEY, T.E., 1958. Control of algae with chlorophenyl-dimethylurea. J. Am.Wat.Wks.Ass., Baltimore, 50(3): 417-422.
109. MALONEY, T.E. & PALMER, C.M., 1956. Toxicity of six chemical compounds to thirty cultures of algae. Wat.Se-wage Wks., Chicago, nov.
110. MALONEY, T.E. & CARNES, R.A., 1966. Toxicity of a Microcystis waterbloom from an Ohio pond. Ohio J. Sci., Columbus, 66(5): 514-518.
111. MALONEY, T.E., MILLER, W.E. & SHIROYAMA, T., 1972. Algal responses to nutrient addition in natural waters, I: laboratory assays. Nutrient and Eutrophication Special Symposia, 1: 134-140.
112. MALONEY, T.E. & MILLER, W.E., 1975. Algal assays: development and application In: Water Quality Parameters. Corvalis: American Society for Testing and Materials: 344-355.

113. MAST, S.O. & PACE, D.M., 1938. The effect of substances produced by Chilomonas paramecium on the rate of reproduction. Physiol. Zool., Chicago, 11: 359-382.
114. McCALLAN, S.E.A. 1956. Mechanisms of toxicity with special references to fungicides. In: Plant Protective Conference Proceedings.:77-95
115. McINTYRE, F.J., 1949. Algae control Wat.Sewage Wks., Chicago, 96: 186-188.
116. McKEE, J.E. & WOLF, H.W., 1963. Water Quality Criteria, 2nd Ed. Sacramento: State Water Quality Control Board 548p.
117. McNEW, G.L., 1960. Fungicides and bactericides for controlling plant diseases. In: Biological and Chemical Control of Plant and Animal Pests: Plenum Press, New York: 49-71.
118. MEDSKER, L.L., JENKINS, D. & THOMAS, J.F., 1968. An earthy-smelling compound associated with blue-green algae and actinomycetes. Environ.Sci.& Tech., Easton, 2 (6): 461-464.
119. MEIER, F., 1932. Cultivating algae for scientific research. Smithsonian Rep., Washington: 373-383.
120. MERRIFIELD, L.S. & YANG, H.Y., 1965. Factors affecting the antimicrobial activity of vitamin K₁. Appl. Microbiol., Baltimore, 13(5): 766-770.
121. MEYER, J.H. 1971. Aquatic herbicides and algicides. Noyes Date Corporation. 52p.
122. MILLER, W., 1976. Aspects of phosphate utilization by blue-green algae. Corvallis: Corvallis Environmental Research Laboratory.

123. MILLER, W.E., MALONEY, T.E. & GREENE, J.C., 1974. Algal productivity in 49 lake waters as determined by algal assays. Water Research, Oxford, 8:667-679.
124. MILLER, W.E., GREENE, J.C. & SHIROYAMA, T., 1975a Application of algal assays to define the effects of waste water effluents upon algal growth in multiple use river systems. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Logan: United States Environmental Protection Agency, Division of Environmental Engineering & Utah State University: 77-92.
125. MILLER, W.E., GREENE, J.C., SHIROYAMA, T. & MERWIN, E., 1975b. The use of algal assays to determine effects of wastes discharges in the Spokane River System. In: Biostimulation-Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Corvallis: United States Environmental Protection Agency: 113-131.
126. MIQUEL, P., 1892. De la culture artificielle des diatoms. Le Diatomiste, 8,9,10,11,12.
127. MONIE, W.D., 1956. Algae control with copper sulfate. Wat. Sewage Wks., Chicago, sept.
128. MOORE, G.T., 1903. Methods for growing algae in pure cultures. Appl. Microbiol., Baltimore, 6: 2309-2314.
129. MOORE, G.T. & KELLERMANN, K.F., 1904. A method of destroying or preventing the growth of algae and certain pathogenic bacteria in water supplies. U.S.D.A. Bureau Plant Industry Bull. 64:1-44.
130. MORAVCOVA, V., 1967. Biological investigations of an infiltration area and experiments with some algicides. Hydrobiologia, Den Haag 29: 505-546.

131. MOUNT, T., 1966. The effect of total hardness and pH on acute toxicity of zinc to fish. Int.J. Air & Wat.Pollut. Oxford, 10:49-56.
132. MOYLE, J.B. 1949. The use of copper sulfate for algae control and its biological implications. Washington, D.C.: American Association for the Advancement of Science. 40p.
133. NASON, H.K., 1938. Chemical methods in slime and algae control. J. Amer.Wat.Wks.Ass., Baltimore, 30:437-440.
134. NESIN, B.C. & DERBY, R.L., 1954. Methods of controlling growth in reservoir. J.Am.War.Wks. Ass., Baltimore, 46 (11): 1141-1158.
135. NOLL, F., 1892. Ueber die Cultur von Meeresalgen, in Aquarien Flora, Treviso, 2: 281-301.
136. OLTMANNS, F., 1892. Ueber die Cultur und Lebensbedingungen des Meeresalgen. Jahrb. Wiss. Bot., Leipzig, 23:349-440
137. OTTO, N.E. & BARTLEY, T.R., 1966. Aquatic weed control studies. In: Water Resources Research Pub. n92. Washington, D.C.: Bureau of Reclamation, United States Department of Interior: 17-20.
138. OTTO, R.H., Alford, E.F., GRUNDY, W.E. & SILVERSTER, J.C., 1960. Antibiotic bactericidal studies: bactericidal and bacteriostatic tests with various antibiotics. In: Antimicrobial Agents Annual. New York: Plenum Press: 104-122.
139. OWENS, R.G. & BLAAK, G., 1960. Chemistry of the reactions of dichlone and captan with thiols. Boyce Thompson Inst. Res. Prof. Pap., Yonkers, 20(8):475-498.
140. PALMER, C.M., 1952. An incubation room for algal cultures in water supply taste and odor research. News Bull.Phico Soc. Am., Urbana, 5(16):9-11.

141. PALMER, C.M., 1956. Evaluation of new algicides for water supply purposes. J. Am.Wat.Wks.Ass., Baltimore, 48(9): 1133-1137.
142. PATRICK, R. & REIMER, C.W., 1966. The diatoms of the United States Exclusive of Alaska and Hawaii, vol.1 Philadelphia: The Livingston Publishing Company. p 1-x+1-688.pl. 1-64.
143. PAYNE, A.G., 1975. Application of the algal assay procedure. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Utah:United States Environmental Protection Agency, Division of Environmental Engineering & Utah State University: 3-28.
144. PERLMAN, D.,1964. Antibiotic inhibition of algal growth. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New York: Plenum Press: 114-119.
145. PHELPS, R.A. & SCHLICHTING,H.E., 1968. The use of a Warburg apparatus to test algicidal compounds. Adv.Front.Plant.Sci. New Delhi, 19:181-194.
146. PORCELLA, D.B., GRAN,P., HUANG, C.H., RADIMSKY, J., TOERIEN, D.F. & PEARSON, E.A., 1970. Provisional algal assay procedures, first annual report S.E.R.L.Report n° 70-8. Berkeley: University of California.
147. PRATT, R., 1942. Some properties of the growth inhibitor formed by Chlorella cells. Am. J.Bot. Lancaster, 29(2): 142-148.
148. PRATT,R., 1943. Retardation of photosynthesis by a growth-inhibiting substance from Chlorella vulgaris. Am.J. Bot., Lancaster, 30(1): 32-33.

149. PRATT, R., 1944. Influence on growth of Chlorella of continuous removal of chlorellin from the culture solution. Am. J. Bot., Lancaster, 31(7): 418-421.
150. PRATT, R., 1945. Influence of the age of culture on the accumulation of chlorellin. Am. J. Bot., Lancaster, 32(7): 405-408.
151. PRATT, R. & FONG, J., 1940. Further evidence that Chlorella cells form a growth inhibiting substance. Am. J. Bot., Lancaster, 27(6): 431-436.
152. PRESCOTT, G.W., 1962. Algae of the western Great Lakes area. Dubuque: W.M.C. Brown Company Publishers p.i-xiii+1- 977. pl 1-136+A1-A7.
153. PRICE, C.A. & ESTRADA, M.T.G., 1964. Chlorophyll formation in Euglena as a test for herbicides. Weeds. New York, 12(3): 234-235.
154. PRINGSHEIM, E.G., 1912. Kulturversuche mit chlorophyll-führenden Mikroorganismen. Mitt. I. Die Kultur von Algem in Agar. Beitr. Biol. Pflan., Berlin, 11: 305-334.
155. PRINGSHEIM, E.G., 1914. Kulturversuche mit chlorophyll-führenden Mikroorganismen. Mitt. III Zur Physiologie der Schizophyceen. Beitr. Biol. Pflan., Berlin, 12: 1-47.
156. PRINGSHEIM, E.G., 1918. Zur Physiologie der endophytischen Cyanophyceen. Arch, Protistenk, Jena, 38: 126-130.
157. PRINGSHEIM, E.G., 1919. Die Kultur von Desmidiaceen. Ber. Deut. Bot. Ges., Berlin, 36: 482-485.
158. PRINGSHEIM, E.G., 1946. Pure culture of algae: their preparation and maintenance. Cambridge. Cambridge University Press. 119p.

159. PROWS, B.L., 1971. Development of a selective algaecide to control nuisance algal growth. Washington, D.C.: United States Department of the Interior. 102p.
160. PROWS, B.L. & McILHENNY, W.F., 1973 Development of a selective algaecide to control nuisance algal growth. Washington, D.C.: United States Protection Agency. 126p.
161. REDDISH, G.F., 1957. Antiseptics, disinfectants, fungicides and sterilization. 2nd Edition. Philadelphia: Lea & Febiger.
162. REYNOLDS, J.H., MIDDLEBROOKS, E.J., PORCELLA, D.B. & GRENNEY, W.J., 1975. Comparison of semi-continuous and continuous bioassays. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Logan: United States Environmental Protection Agency, Division of Environmental Protection Agency, Division of Environmental Engineering & Utah State University: 241-266.
163. RICHTER, O., 1903. Reinkultur von Diatomen. Ber. Dtsch. Bot. Ges., Berlin, 21:493-506.
164. RIDENOUR, G. & ARBRUSTER, E.H., 1948. Some factors affecting the properties of quaternary ammonium compounds as sanitizers. Am. J. publ. Hlth., New York, 38:504-511.
165. RIEMER, D.N. & TOTH, S.J., 1967. Second progress report on the behaviour of copper sulfate in ponds. New York: Phelps Dodge Refining Corporation.
166. RIEMER, D.N. & TOTH, S.J., 1970. Adsorption of copper by clay minerals; humic acid and bottom muds. J. Am. Wat. Wks. Ass., Baltimore, 62(3): 195-197.

167. RINGER, W.C. & CAMPBELL, S.J., 1955. Use of chlorine dioxide for algae control at Philadelphia. J. Am. Wat. Wks. Ass., Baltimore, 47:740-743.
168. RODHE, W., 1948. Environmental requirements of the fresh-water plankton algae. Experimental studies in ecology of phytoplankton. Synb. Bot. Upss. Upssala, 10:1-149.
169. ROUND, F.E., 1965. The biology of the algae London: Edward Arnold Ltd. p. i-vii+1-269 fig 1-69.
170. SANT'ANNA, C.R.L., PEREIRA, H.A.S.L., & BICUDO, R.M.T. 1978. Contribuição ao conhecimento das Cyanophyceae do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. Rev. Brasil. Biol., Rio de Janeiro, 38(2):321-337.
171. SCHATZ, A., SCHATZ, V., SCHALSCHA, E.B. & MARTIN, J.J., 1964. Soil organic matter as a natural chelating material. Compost Sci. Emmaus, 4:25-29.
172. SCHRAMM, J.R. 1914. Some pure cultures methods in the algae. Ann. Mo. Bot., Gard, St. Louis, 1: 23-45.
173. SHIROYAMA, T., MILLER, W.E. & GREENE, J.C., 1975a. Comparison of the algal growth responses of Selenastrum capricornutum Printz and Anabaena flos-aquae (Lyngb.) De Brebisson in waters collected from Shagawa lake. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Logan United States Environmental Protection Agency, Division of Environmental Engineering & Utah State University: 127-148.
174. SHIROYAMA, T., MILLER, W.E. & GREENE, J.C. 1975b. Effect to nitrogen and phosphorus on the growth of Selenastrum capricornutum Printz. In: Biostimulation-Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Corvallis: United States Environmental Protection Agency: 132-142.

175. SIKKA, H.C., & PRAMER, D., 1968. Physiological Effects of fluometuron on some unicellular algae. Weed.Sci., Gainesville, 16:296-299.
176. SINGH, P.K., 1974. Algicidal effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on blue-green alga Cylindrospermum sp. Arch. Mikrobiol., Berlin, 97: 69-72.
177. SKIDMORE, J.F., 1964. Toxicity of zinc compounds to aquatic animals with special reference to fish. Q.Rev. Biol., Stony Brook, 39: 227-248.
178. SLADECKOVA, A. & SLADECK, V., 1968. Algicides-friends or foes? In: Algae, Man and Environment. Syracuse: Syracuse University Press: 441-458.
179. SMITH, G.M., 1950. The fresh water algae of the United States. New York, Toronto & London: McGraw-Hill Book Company. p.i-vii+ 1-719.fig.1-559.
180. SMITH, P.D., 1975. The use of in situ algal assays to evaluate the effects of sewage effluents on the production of Shagawa lake phytoplankton. In: Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceedings. Corvallis: United States Environmental Agency: 143-173.
181. SPOEHR, H. MILNER, H. & STEPHENS, E., 1949. Fatty acid antibacterials from plants. Carnegie Inst. Washington Washington:586-592.
182. STEPANEK, M. CHALUPA, J. MASINOVA, L., POKORNY, J. & SVEC, J., 1960. Application of algicide C.A.350 in reservoirs. Scien.Pap. Inst.Chem. Technol., Praha, 7(2): 175-263.

183. TOERIEN, D.F., HUANG, C.H., RADINSKY, J., PEARSON, E.A. & SCHERFIG, J., 1971. Final report, provisional algal assay-procedures. S.E.R.L. Report n° 71-6. Berkeley: Sanitary Engineering Research Laboratory.
184. TOTH, S.J. & RIEMER, D.N., 1968. Precise chemical control of algae in ponds. J.Am.Wat.Wks.Ass., Baltimore, 60: 367-371.
185. TURRE, G.J., 1939. Combating algae growth in the Denver water supply. Taste Odor Control J., New York, 5(6): 118-127.
186. UKELES, R., 1962. Growth of pure cultures of marine phytoplankton in the presence of taxicants. Appl. Microbiol., Baltimore, 10: 532-537.
187. U.S. Environmental Protection Agency, 1969. Provisional Algal Assay Procedure. Corvallis: National Eutrophication Research Program.
188. U.S. Environmental Protection Agency, 1971. Algal assay procedure: bottle test. Corvallis: National Eutrophication Research Program. 82p.
189. VANCE, B.D., 1966. Sensitivity of Microcystis aeruginosa and other blue-green algae and associated bacteria to selected antibiotics. J. Phycol., Washington, 2: 125-128.
190. WELCH, E.B., BUCKLEY, J.A. & BUSH, R.M., 1972. Dilution as an algal bloom control. J.Wat.Pollut.Control Fed., Washington, 44(12): 2245-2265.
191. WHEELER, R.E., LACKEY, J.B. & SCHOTT, E., 1942. A contribution on the toxicity of algae. Publ.Hlth.Rep., Washington, 57: 1695-1701.

192. WHITTON, B.A., 1968. Effect of light on the toxicity of various substances to Anacystis nidulans. Plant Cell Physiol., Tokyo, 9:23-26.
193. WILLIAMS, O.B., GRONIGER, C.R. & ALBRITTON, M.F., 1952. The Algicidal effect of certain quaternary ammonium compounds. Prod.Mon., Bradford, 16(8):14-15.
194. ZEHNDER, A. & HUGHES, E.O., 1958. The antialgal activity of acti-dione. Can. J. Microbiol., Ottawa, 4:399-408.
195. ZWEIG, G., HITT, T.E. & McMAHON, R., 1968. Effect of certain quinones, diquat and diuron on Chlorella pyrenoidosa Chick (Emerson strain). Weed.Sci., Gainesville, 16:69-73.