

EFEITO DE BIOCIDAS E TOLERÂNCIA À EXPOSIÇÃO AO AR

Miriam e. Maroñas¹ e Cristina Damborenea²

INTRODUÇÃO

Os problemas provocados pela introdução não intencional na bacia do Prata do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), impactam tanto o ambiente natural como o humano. Neste último, o mexilhão dourado produz severos danos na infra-estrutura de plantas industriais, de tratamento de água e geradoras de energia que tomam água dos rios para seu funcionamento, provocando *macrofouling* na água doce da América do Sul (Darrigran, 1997; Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000). Na América do Norte, a corbicula asiática, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) e, em especial, o mitilídeo comumente conhecido como mexilhão zebra, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), ocasionam sérios problemas nas indústrias. Dada a ampla distribuição deste último mexilhão e os sérios prejuízos econômicos que causa, existem numerosos estudos acerca de suas respostas ecofisiológicas frente a exposição às substâncias químicas potencialmente utilizáveis como agentes de controle e sobre a tolerância desta espécie à exposição ao ar por tempo prolongado. Sobre prejuízos das indústrias sul-americanas, os conhecimentos em relação ao mexilhão dourado são escassos, apesar do alto impacto já provocado por esta espécie.

Neste capítulo apresentaremos uma síntese das experiências obtidas por vários autores, tanto em âmbito local como internacional, sobre o efeito de diversos biocidas e sobre a tolerância do *L. fortunei* à exposição ao ar. Estas experiências constituem um elemento fundamental para estabelecer metodologias sustentáveis de prevenção e controle do mexilhão dourado nos sistemas de água industriais.

BIOCIDAS

Por definição, um biocida é um causador de morte. Este termo é aplicado aos produtos químicos utilizados para matar organismos vivos, tanto os que interferem ou ameaçam a saúde como os que afetam as atividades humanas. Entretanto, em geral, não se consideram como biocidas os antibióticos usados na medicina. Alguns biocidas são seletivos, quer dizer, são mais potentes contra um número pequeno de espécies que contra outras. Ao contrário, outros são tóxicos indiscriminados. O “biocida ideal” é uma substância altamente tóxica para um tipo particular de organismo ou grupo de organismos e que não tem efeitos prejudiciais para o resto dos componentes biológicos do sistema. Além disso, este “composto ideal” não reage com os elementos abióticos do ambiente e se dissocia em formas não tóxicas. Como se sabe, este “biocida ideal” ainda não foi obtido, mas ante a necessidade de ser utilizado na prevenção do assentamento e/ou no controle efetivo do *biofouling* em sistemas de águas, as investigações se orientam no sentido de minimizar os impactos ambientais.

¹ Instituto de Limnología .Dr. R. Ringuelet., CC 712 (1900) La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Calle 122 y 61 (1900) La Plata. Argentina. miriam@ilpla.edu.ar

² Grupo de Investigación en Moluscos Invasores/Plaga (GIMIP). División Zoología Invertebrados. Facultad Ciencias Naturales y Museo. Paseo del Bosque. (1900) La Plata. Argentina. cdambor@fcnym.unlp.edu.ar

São numerosos os químicos empregados como biocidas. De acordo com seu mecanismo de ação se diferenciam em oxidantes e não oxidantes. Entre os primeiros, se destaca o cloro como substância utilizada universalmente, e também se pode mencionar o ozônio, o peróxido de hidrogênio e o permanganato de potássio, entre outros. Várias substâncias químicas não oxidantes foram desenvolvidas como agentes de controle sobre bactérias ou algas e seu uso se estendeu aos moluscos (molusquicidas).

Cloro

O cloro foi aplicado amplamente nos tratamentos de água para o consumo humano desde princípios do século XX. Em épocas recentes, a cloração com hipoclorito de sódio começou a utilizar-se de forma muito extensa nos sistemas de água como método para o controle do *biofouling*.

De todos os desinfetantes é o mais intensamente estudado em relação a sua química, toxicidade e ecotoxicidade. Por isso, ao estar tecnologicamente bem comprovado e porque seu custo econômico é aceitável, é utilizado universalmente nas indústrias. Entretanto, está muito longe de possuir as características do “biocida ideal”.

A ação do cloro como agente de controle do *biofouling* se realiza através de seu efeito tóxico oxidante direto sobre os organismos, por inibição do assentamento e do crescimento dos estágios larvais, ou por debilitar os mecanismos pelos quais os indivíduos permanecem fixos ao substrato (Claudi & Mackie, 1994).

Dispõe-se de compostos para a cloração a partir de vários produtos químicos. Os mais frequentemente utilizados são o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o cloro gasoso (Cl₂). Muitos fatores, tais como o pH, o conteúdo de nitrogênio orgânico e inorgânico e a temperatura, afetam o poder oxidante do cloro. Conjuntamente, deve-se considerar as propriedades emergentes de cada população como, por exemplo, sua estrutura de idade ou de tamanhos, sua densidade, sua biomassa, já que diferentes populações terão respostas desiguais frente a concentrações semelhantes do oxidante. Por estas razões é necessário testar sua efetividade tendo em conta as condições próprias da instalação a ser tratada.

Conhecem-se numerosas investigações acerca do efeito do cloro em outros bivalves invasores como os já nomeados *D. polymorpha* e *C. fluminea*. No *L. fortunei*, os primeiros estudos para determinar a eficácia do cloro como agente para seu controle foram os realizados por Morton *et al.* (1976). Estes autores trabalharam com exemplares adultos provenientes da represa de Plover Cove de Hong Kong, utilizando grupos de organismos sem especificar seu tamanho. Mais recentemente, Cataldo *et al.* (2003) realizaram vários ensaios com indivíduos desta espécie coletados nas costas do Rio da Prata, na localidade de Quilmes (Buenos Aires, Argentina).

Morton *et al.* (1976) utilizaram agrupamentos com aproximadamente 30 indivíduos que foram colocados em tanques com água proveniente do ambiente natural (a represa), mantendo-a em circulação. Os mexilhões dourados foram alimentados durante todo o tempo de duração da experiência. Realizaram ensaios com três tratamentos diferentes, nos quais se aplicou cloro em: (a) baixas concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mg/L), adicionando hipoclorito de sódio a cada quatro horas para manter a concentração constante; (b) altas concentrações (200; 300 e 400 mg/L), sem cloro adicional e, por último (c), altas concentrações (200; 300 e 400 mg/L) por um período de quatro dias e, a seguir, os animais permaneceram expostos a baixas concentrações (1 mg/L), adicionando hipoclorito de sódio a cada quatro horas. Os tratamentos realizados tiveram diferente duração temporal e sempre se mantiveram grupos de controle com água procedente da represa.

Os ensaios realizados por Cataldo *et al.* (2003) foram levados a cabo com 6 concentrações de cloro diferentes (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mg/L) a temperaturas de 15, 20 e 25 °C. A concentração de

cloro foi mantida de forma constante pela adição de hipoclorito de sódio uma vez por dia. Os organismos utilizados tinham entre 15-25 mm de comprimento máximo valvar e se encontravam fixos nas superfícies de ensaio. Neste estudo não se lhes proporcionou alimento durante o desenvolvimento das experiências. Estes autores mantiveram grupos de controle e todas as rotinas foram levadas a cabo em triplicata. A cada 24 horas removeram os indivíduos mortos identificados pela ausência de resposta frente a estímulos mecânicos.

Morton *et al.* (1976) encontraram que baixas concentrações do cloro não produzem mortalidade imediata, mas que, recém transcorridos 24 dias, com uma concentração de 0,2 mg/L, pode registrar 37% de mortalidade, considerando que a mortalidade no grupo controle tinha sido de 11%. Na Tabela 1 se consignam a dose letal cinquenta (LD_{50}) estimadas para as distintas concentrações utilizadas. Neste trabalho, os autores não especificam as temperaturas de realização dos ensaios, mas pode deduzir-se, pela informação aportada nos gráficos, que a mesma estava na faixa de 19,8-21,8 °C. Morton *et al.* (1976) concluem que, com dose entre 200-400 mg/L, 50% dos espécimes morre aos 6 dias, mas se depois se aplicam baixas doses de cloro para manter as concentrações de 1 mg/L, vai

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade com distintas doses de cloro e para diferentes temperaturas obtidas para o *Limnoperna fortunei* e *Dreissena polymorpha* em diferentes experiências.

| | Dias | Doses (mg/L) | Temp. (°C) | Mortalidade (%) | Comprimento valvar (mm) | |
|----------------------|--------|--------------|------------|-----------------|-------------------------|--|
| <i>L. fortunei</i> | 5.6 | 200 | | 50 | | Morton <i>et al.</i> (1976). |
| | 6 | 300-400 | | 50 | | |
| | 14 -15 | 1,0-1,2 | | 50 | | |
| | 31 | 0,1 | | 50 | | |
| <i>L. fortunei</i> | 25 | 93,2 | 15 | 50 | 15-25 | Cataldo <i>et al.</i> (2003). |
| | 30 | 51,7 | 15 | 50 | | |
| | 35 | 27,2 | 15 | 50 | | |
| | 40 | 14,0 | 15 | 50 | | |
| | 45 | 2,1 | 15 | 50 | | |
| | 20 | 3,3 | 20 | 50 | | |
| | 25 | 1,2 | 20 | 50 | | |
| | 10 | 5,5 | 25 | 50 | | |
| <i>D. polymorpha</i> | 4 | 8,0 | 12 | 50 | 2-10 | Martin <i>et al.</i> (1993). |
| | 6 | 5,0 | 12 | 50 | | |
| | 29 | 5,0 | 12 | 100 | | |
| | 10 | 2,5 | 12 | 50 | | |
| | 22 | 2,5 | 12 | 100 | | |
| | 15 | 1,0 | 12 | 50 | | |
| <i>D. polymorpha</i> | 25 | 1,0 | 20 - 22 | 100 | 0,75-2 | Van Benschoten. En: Van Benschoten <i>et al.</i> (1993). |
| <i>D. polymorpha</i> | 28 | 1,0 | 8 -12 | 70 | > 2-5 | Lewis. En: Van Benschoten <i>et al.</i> (1993). |

assegurar a mortalidade da população restante em 11 dias. Há que assinalar que com concentrações entre 200-400 mg/L de cloro se produz um marcado incremento na alcalinidade, chegando o pH a valores próximos a 10. Morton *et al.* (1976) destacam que este fator poderia contribuir para a mortalidade do mexilhão dourado. Os resultados obtidos por Montalto e Marchese (2003) para o *L. fortunei* com respeito ao pH confirmam que valores de 10 produzem uma alta mortalidade. Estes últimos autores trabalharam com organismos divididos em três grupos de tamanho segundo seu comprimento máximo valvar: os recrutas até 6 mm; adultos de 6 até 15 mm; e adultos com uma altura maior, de 15 até 27 mm. A temperatura da experiência teve uma média de 21 ± 1 °C. O tempo no qual ocorreu a morte estava relacionado com o tamanho da valva, já que os indivíduos maiores mostraram maior tolerância que os menores. De todas as formas, em 72 horas após iniciada a experiência, a mortalidade era próxima de 100% para todas as alturas que formaram parte dos ensaios.

Na Tabela 1 também se sintetizam os valores estimados por Cataldo *et al.* (2003) de LD_{50} sob as três temperaturas das experiências e para distintas concentrações de cloro. Estes autores observam que a 15°C com doses de até 100 mg/L se necessitam entre duas e quatro semanas para provocar 100% de mortalidade, enquanto que com doses de 5 a 100 mg/L e 20 °C esta mortalidade é alcançada em quatro semanas. Em troca, com temperaturas de 25 °C, o tempo requerido para alcançar 100% de mortalidade diminui notavelmente; com 100 mg/L de cloro apenas 11 dias, enquanto que com 1-5 mg/L são necessários 17 dias para obter tal mortalidade.

Cataldo *et al.* (2003) apresentam resultados em parte coincidentes com o trabalho prévio de Morton *et al.* (1976) e outros realizados para o *Dreissena polymorpha* (Tabela 1).

Os estudos realizados demonstram que tratamentos breves com cloro não são efetivos para controlar a totalidade da população. Em investigações efetuadas em outros bivalves (de Kock & Bowmer, 1993) foi observado que isto se deve fundamentalmente ao fato de que os organismos detectam a substância tóxica e, como resposta, fecham as valvas impedindo o ingresso do agente oxidante. Somente com temperaturas superiores a 25 °C e concentrações maiores que 25 mg/L o cloro afetaria significativamente a taxa de sobrevivência dos bivalves dentro dos primeiros dois ou três dias de exposição. Supõe-se que isto se deve a que em animais poiquilotérmicos, expostos a maiores temperaturas, se produz um incremento da taxa metabólica e, em consequência, há uma aceleração na incorporação do agente oxidante incrementado o potencial tóxico do mesmo.

Molusquicidas

Apesar dos compostos não oxidantes, utilizados como biocidas, resultaram em alto custo, possuem algumas vantagens com respeito ao cloro. Estas substâncias são relativamente inertes em relação aos materiais constitutivos dos sistemas de água das indústrias e, até o presente, não se detectaram reações com elementos do meio, produzindo compostos cancerígenos ou deletérios, tal como ocorre com os oxidantes. Além disso, para o controle de moluscos, são efetivos em baixas concentrações, se desativam rapidamente e são de simples manipulação para sua aplicação.

Polímero de amônio quaternário

Nos Estados Unidos foi usado um composto catiônico líquido de amônio poliquaternário (BULAB 6002®) para o controle de algas em tanques de natação. Este composto é um íon de n polímeros de cadeia aberta com átomos de nitrogênio carregados positivamente na coluna de sua cadeia polimérica. Também é utilizado como microbiocida em sistemas de águas comerciais e industriais, e empregado como molusquidica na prevenção e controle do *biofouling*, especialmente o causado pelo *Dreissena polymorpha* (Martin *et al.*, 1993; McMahon *et al.*, 1993). O BULAB 6002® se liga com as superfícies carregadas negativamente, incluindo os microorganismos e as membranas

dos moluscos. Estes últimos não são capazes de detectar a substância ativa como um agente nocivo e, portanto, não fecham suas valvas ao serem expostos ao molusquicida que provoca rapidamente a morte.

Darrigran *et al.* (2001) realizaram uma primeira aproximação ao estudo do efeito deste tipo de molusquicida sobre as larvas do mexilhão dourado. Para o desenvolvimento das experiências coletaram o material planctônico com uma rede de fitoplâncton na ribeira do Rio da Prata (Ensenada, Província de Buenos Aires). Uma vez no laboratório, tomaram alíquotas que foram observadas sob lupa e, com uma micropipeta, extraíram as larvas véliger umbonadas (237,5-287,5 micras) de *Limnoperna fortunei* que utilizaram de forma imediata nas experiências. As concentrações ensaiadas foram de 1, 2, 4, 8 e 16 ppm da substância ativa do BULAB 6002®. As soluções foram preparadas com água corrente da rede domiciliar parada. Em cápsulas de Petri colocaram entre 9 a 10 larvas e, como controle, prepararam brancos com 10 larvas na água utilizada como diluente. Realizaram toda a experiência em duplicata e à temperatura ambiente de 18 ± 2 °C. O ensaio foi controlado nas 24 horas, contando (sob microscópio estereoscópico) a quantidade de larvas sem nenhum tipo de mobilidade (consideradas como mortas) e as que apresentavam algum sinal de atividade (consideradas como vivas). Na Figura 1, pode observar-se o resultado da experiência. Os resultados foram tratados com o programa de análise Probit da EPA para o cálculo da concentração letal (LC_{50}) de testes de toxicidade de distintas substâncias. A LC_{50} da réplica 1 resultou ser 9,6 ppm, e a da réplica 2 foi de 4,65 ppm. Os autores comprovaram, mediante a prova de Qui-quadrado, que a diferença entre os valores esperados e os observados não eram significativas.

Cabe destacar que Darrigran *et al.* (Ms) assinalam que, nas 24 horas de iniciada a experiência, se comprovou que nas cápsulas destinadas para controle, além de se acharem apenas indivíduos vivos, as larvas podiam qualificar-se como nadadoras ativas. Nas cápsulas restantes, qualquer que tenha sido a concentração da substância tóxica, as larvas que permaneciam vivas (certificado pelo movimento ciliar interno) deviam ser qualificadas como inativas, já que permaneciam depositadas no fundo da cápsula. O experimentado pelos grupos controle permite determinar que as mudanças de comportamento ou a morte das larvas foram induzidas pelo BULAB 6002®, e que as larvas desta espécie são muito sensíveis a este tóxico, já que na menor concentração de substância ativa utilizada foram encontradas inativas dentro das 24 horas de iniciado o ensaio. Seria recomendável a experimentação com concentrações menores que 1 ppm com a finalidade de avaliar a mínima concentração necessária para obter a inatividade larval.

O BULAB 6002® pode também ser utilizado para a limpeza dos sistemas quando nestes foram desenvolvidos assentamentos importantes de organismos adultos. Desta forma, utilizando concentrações, tempos e um sistema de recirculação adequado, se consegue matar e desprender a população assentada. Darrigran e Damborenea (2001) realizaram ensaios com esta substância em diferentes concentrações e para distintos tamanhos de *L. fortunei*. Os exemplares adultos utilizados provinham do estuário Rio da Prata (Berisso, Buenos Aires, Argentina) os quais foram previamente aclimatados às condições de laboratório. Os ensaios de toxicidade se realizaram de forma estática, com renovação do meio a cada 24 horas, a uma temperatura de 24 ± 1 °C. Os animais selecionados por altura foram dispostos em potes, colocados em aquários com água do ambiente e água corrente (2:1) para obter a fixação à superfície oferecida. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Para o controle das experiências se utilizaram testemunhos tratados sob as mesmas condições. As soluções finais se realizaram a partir de uma solução inicial de BULAB 6002® com 60% de substância ativa. Efetuaram-se um total de seis ensaios em três concentrações diferentes (8, 12 e 20 ppm de substância ativa) (Tabela 2).

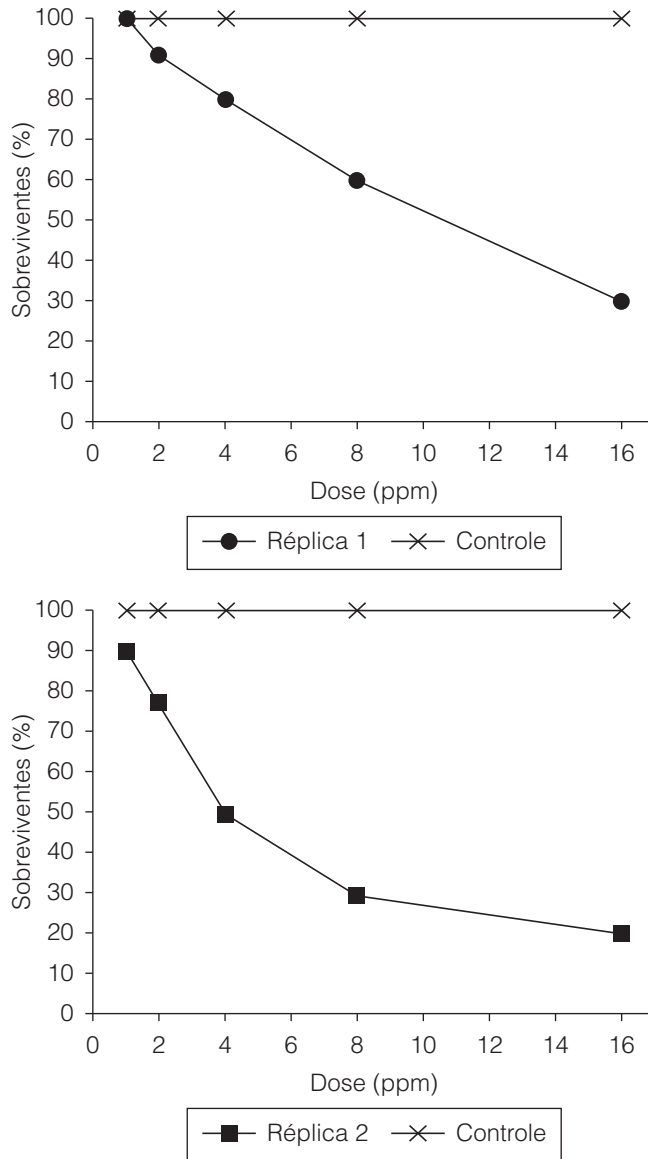


Figura 1. Porcentagem de larvas véliger umbonadas de *Limnoperna fortunei* sobreviventes, nas 24 horas depois de iniciados os ensaios, em distintas concentrações de BULAB 6002® e em grupos utilizados como controle. Modificada de Darrigran *et al.* (2001).

Tabela 2. Tamanho médio de *Limnoperna fortunei* e concentração de BULAB 6002® em cada um dos ensaios realizados por Darrigran e Damborenea (2001).

| Ensaio | Concentração do tóxico (ppm) | Comprimento valvar (mm)/Média (faixa) | n |
|--------|------------------------------|---------------------------------------|-----|
| 1 | 8 | 10,80 (6 a 14) | 416 |
| 2 | 8 | 19,97 (18 a 29) | 377 |
| 3 | 12 | 12,45 (4,5 a 16) | 659 |
| 4 | 12 | 20,17 (18 a 27) | 625 |
| 5 | 20 | 7,30 (2,5 a 12) | 325 |
| 6 | 20 | 22,76 (18 a 33) | 305 |

A mortalidade do *L. fortunei* foi monitorada a cada 24 horas, observando-se, sob microscópio estereoscópico, a atividade dos mexilhões colocados em água do ambiente e sua resposta diante estímulos sobre o manto. As experiências realizadas se estenderam por um total de 168 horas.

Os resultados de Darrigran e Damborenea (2001) indicam que em 168 horas, com concentrações de 8 ppm (ensaios 1 e 2) e de 12 ppm (ensaios 3 e 4) de BULAB 6002®, não se alcançou 100% de mortalidade dos adultos de *L. fortunei* (Figura 2). Para concentrações de 8 ppm se registrou uma mortalidade de 78,88% (ensaio 1) e de 75,00% (ensaio 2), e com 12 ppm a mortalidade foi de 88,83% (ensaio 3) e de 82,14% (ensaio 4). Entretanto, com 20 ppm, a mortalidade de 100% foi alcançada nas 120 e 144 horas para os ensaios 5 e 6, respectivamente.

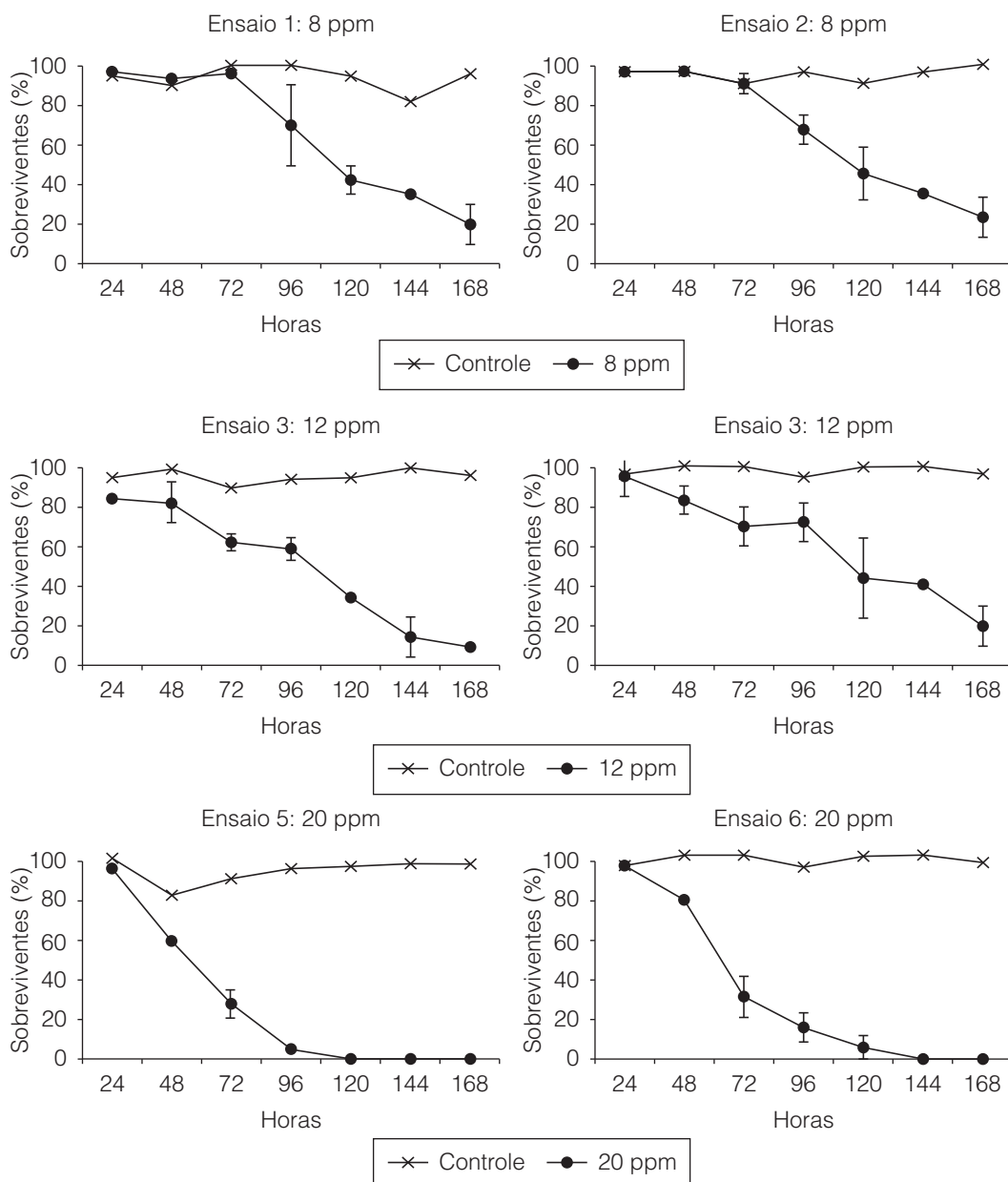


Figura 2. Porcentagem de adultos de *Limnoperna fortunei* sobreviventes ao longo do tempo em distintas concentrações de BULAB 6002® e em grupos utilizados como controle. Modificada de Darrigran e Damborenea (2001).

Tantos os adultos de *L. fortunei*, como seus estágios larvais, são sensíveis a esta substância tóxica. Nos Estados Unidos se desenvolveram ensaios semelhantes (Martin *et al.*, 1993), com esta mesma substância, para o *Dreissena polymorpha* (mexilhão zebra). Nestes, os indivíduos de 2 a 8 mm de comprimento valvar expostos a 8 ppm apresentam uma mortalidade de 100% nas 144 horas. Segundo os resultados de Darrigran e Damborenea (2001), no caso do *L. fortunei* a mortalidade não é maior que 80% com concentrações semelhantes do composto e depois de 168 horas de experiências. Este fato indica que os adultos de *L. fortunei* são mais resistentes a este biocida que os do mexilhão zebra.

Cabe destacar que este biocida é um tóxico não seletivo que, ao ser despejado ao ambiente causa um impacto indesejado de acordo com a concentração utilizada. Para ensaiar a aplicação de *shocks* desta substância em concentrações adequadas para a limpeza do sistema de água com abundantes assentamentos, estes devem realizar-se em circuitos fechados, onde o tóxico não seja liberado ao ambiente quando finalizado o processo, exceto se for previamente desativado.

Outros molusquicidas testados

Cataldo *et al.* (2003) estudaram em laboratório o efeito de outros três molusquicidas líquidos sobre o mexilhão dourado. Os compostos utilizados foram:

- a) Molusquicida 1. Um composto de amônio quaternário, com uns 50% de substância ativa, que é um surfactante catiônico da família dos *n* alquil dimetilbenzil cloreto de amônio.
- b) Molusquicida 2. Um composto orgânico contendo uma solução de um álcali de amônio poli-quaternário (didecil dimetil cloreto de amônio) com uns 50% de substância ativa.
- c) Molusquicida 3. Um composto orgânico, o 2, 5' dicloro 4' nitrosalicilanilida.

Os primeiros dois molusquicidas foram amplamente testados para serem utilizados como agentes de controle do mexilhão zebra na América do Norte, e o terceiro é usado em países tropicais para o controle de caracóis de água doce, vetores da esquistossomose.

Cataldo *et al.* (2003) realizaram os ensaios com organismos de entre 15-25 mm de comprimento valvar máximo, coletados nas costas do Rio da Prata (Quilmes, Buenos Aires, Argentina). As provas de toxicidade foram levadas e realizadas em triplicata nas temperaturas de 15, 20 e 25 °C. Os molusquicidas foram diluídos com água corrente desclorada e mantiveram grupos de controle. Nem o controle nem os tratamentos foram alimentados durante as provas. O tempo de exposição dos organismos à ação do tóxico foi de 48 horas; a cada 24 horas comprovaram a quantidade de indivíduos vivos e mortos dos distintos ensaios. Os dois compostos de amônio quaternário (molusquicidas 1 e 2) foram testados com concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 20 e 30 mg/L e, para o denominado molusquicida 3, as concentrações foram de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 mg/L. Para o molusquicida 2 a 25 °C, testaram concentrações de 0,5 e 0,75 mg/l necessárias para o cálculo da dose letal 50% (LC₅₀). Já que, de acordo com as especificações técnicas, os molusquicidas apresentam uma ação residual uma vez concluída a exposição, os organismos que permaneceram vivos foram transferidos para águas livres de tóxico e sua resposta monitorada durante vários dias.

Segundo os resultados apresentados por Cataldo *et al.* (2003) para 15°C, o molusquicida 1 não provocou uma mortalidade de 100% em nenhuma das concentrações ensaiadas, ainda se realizaram observações até dez dias posteriores à exposição. Para as outras duas temperaturas, a partir de 2,5 mg/L de concentração, depois do terceiro dia pós exposição, a mortalidade alcançou valores entre 80-100%. E concentrações maiores, chegaram a 100% de mortalidade em menor tempo. O molusquicida 2 foi efetivo, ao provocar uma mortalidade de 100%, sob todas as temperaturas, quando os moluscos estiveram expostos às altas concentrações de substância ativa. Com 25 °C sua efetividade foi também alta para baixas concentrações. O molusquicida 3 foi o mais eficaz na mais

baixa temperatura, tendo um efeito notável sobre todo o primeiro dia de exposição. Em temperaturas elevadas e concentrações superiores a 0,5 mg/L do molusquicida 3 foram muito efetivos. Em 72 horas de exposição causou a mortalidade de todos os organismos. Na Figura 3, se apresentam os resultados da LC_{50} obtidos pelos autores.

Como se verificou no gráfico anterior, a dose depende não apenas do efeito do molusquicida como agente tóxico para esta espécie, mas também da temperatura sob a qual está atuando. Nesta análise se aplica o mesmo raciocínio exposto para a ação do cloro. Em temperaturas elevadas ocorre um incremento da taxa metabólica dos organismos e, portanto, a aceleração da incorporação do molusquicida, e um incremento de sua potencial toxicidade. A aplicação de um molusquicida sobre esta espécie deve levar em conta este fato e, se for possível, realizá-la na época de maiores temperaturas para intensificar seu efeito.

TOLERÂNCIA À EXPOSIÇÃO AO AR

A tolerância à exposição ao ar e a capacidade de fixar-se fortemente a substratos por seu bisso são características próprias dos mitilídeos, graças as quais têm podido aproveitar a alta disponibilidade de recursos existentes nos sistemas intermareais. Estas propriedades também têm favorecido a propagação antropocórica por via terrestre de uma bacia a outra dos bivalves de água doce epifaunales (Griffiths *et al.*, 1991; Ricciardi *et al.*, 1994; Mansur *et al.*, 1999).

Iwasaki (1997) foi quem realizou os primeiros ensaios em laboratório sobre a resistência do *L. fortunei* à exposição ao ar. Os indivíduos utilizados nas experiências provinham de coletas realizadas no Rio Uji (Japão Central). Uma vez em laboratório, foram aclimatados durante dois dias, com alimento abundante (*Chlorella sp.* e *Euglena sp.*). Suas experiências consistiram em expor indivíduos isolados ao ar atmosférico, com um comprimento máximo valvar entre 4 e 34 mm, numa faixa de temperatura entre 26-30 °C e umidade relativa entre 72-81%. A cada 24 horas, Iwasaki verificou o número de indivíduos mortos medindo-lhes o comprimento máximo valvar. Segundo este autor, para os pequenos mexilhões (<10 mm), a sobrevivência média foi de 3,2 dias, caindo abruptamente

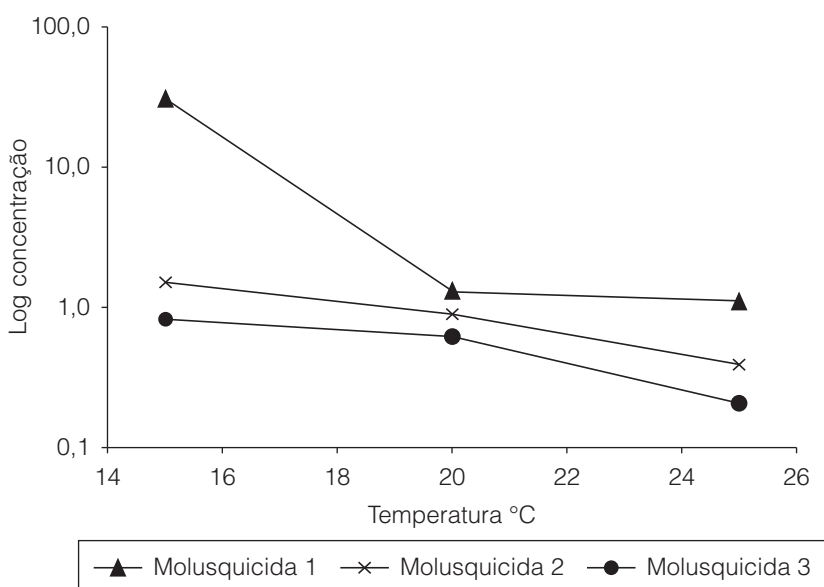


Figura 3. Dose letal 50 de 48 horas de exposição nas três temperaturas das experiências e para os três molusquicidas ensaiados. Dados tomados de Cataldo *et al.* (2003).

até o 4º dia do experimento. No 5º dia todos estavam mortos. À sobrevivência média se acrescentou o incremento em comprimento da valva (Figura 4). Entretanto, no 10º dia do experimento, registrou-se 100% de mortalidade. Lamentavelmente, seu projeto experimental não incluiu grupos testemunhos ou controles, o que impede de identificar a única causa de mortalidade. Em suas conclusões, Iwasaki sugere que, em condições de campo se incrementaria a sobrevivência dos indivíduos, já que é conhecido o fato de que a disposição em camada ou a agregação de organismos melhora as condições de vida dos indivíduos do mexilhão, por meio do incremento da umidade, e da menor temperatura nas camadas interiores do agregado.

Darrigran *et al.* (2004) também examinaram, em condições de laboratório, a resposta do *L. fortunei* à exposição ao ar sob diferentes condições de umidade relativa, avaliando a mortalidade em função do tempo. Os exemplares utilizados foram coletados na costa do estuário do Rio da Prata (Ensenada, Buenos Ars, Argentina). Prévio às experiências, durante 48 horas, os mexilhões foram aclimatados em laboratório, em aquários com água potável, com aeração permanente, e alimentados com algas (*Scenedesmus sp.*) cultivadas em laboratório. O experimento consistiu em separar agregados de indivíduos que denominaram “rosetas”, distribuídas de forma equidistante em bandejas plásticas. Em uma primeira etapa expuseram dois lotes de rosetas ao ar atmosférico (S1 e S2) e mantiveram outro como controle (C1). Na seguinte experiência expuseram dois lotes de rosetas ao ar atmosférico (S3 e S4) enquanto que outros dois foram mantidos cobertos com um lenço umedecido à saturação a cada 24 horas (H1 e H2). Aqui também utilizaram um grupo de rosetas como controle (C2). Ambas etapas foram realizadas em uma habitação fechada sem incidência do sol, a uma temperatura média de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e com uma umidade relativa ambiente que oscilou entre um mínimo de 49% e um máximo de 63%. Os controles foram mantidos com água potável aerada sem agitação e alimento. Diariamente, extraíram uma roseta de cada uma das unidades experimentais, separaram os indivíduos, e depois os submergiram em água corrente aerada. Depois de 18 horas determinaram e contaram os exemplares que permaneciam vivos e os mortos, e a todos lhes mediram o comprimento máximo valvar. Com a informação obtida calcularam a porcentagem de indivíduos sobreviventes em cada tratamento e amostragem. Também, em todos os casos, realizaram o ajuste ao modelo normal acumulado das porcentagens de indivíduos mortos em função do tempo, utilizando a técnica de mínimos quadrados, e calcularam a quantidade de horas necessárias para que 50% e

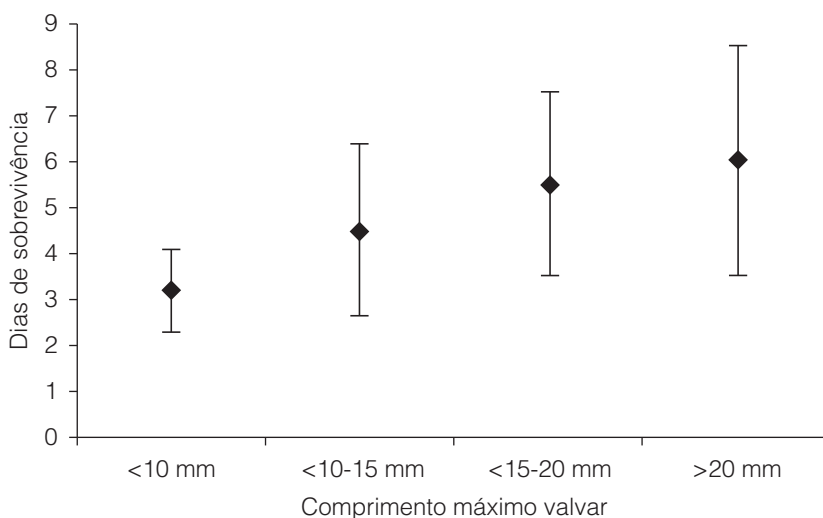


Figura 4. Sobrevivência média em dias dos indivíduos de *L. fortunei* de distintas classes de tamanho expostos ao ar. Modificado de Iwasaki (1997).

100% dos indivíduos morressem. Além disso, classificaram os indivíduos de cada roseta em três categorias de comprimento valvar <10; 10-20 e >20 mm, e analisaram a mortalidade em função da altura (Figura 5).

É notável o incremento da sobrevivência do *L. fortunei* em maior umidade relativa (Figura 5). Nos casos de exposição permanente, os indivíduos não sobreviveram mais que 120 horas, com exceção da experiência S2 aonde aproximadamente 3% permaneceram vivos por mais tempo. Os indivíduos umedecidos diariamente sobreviveram até 168 horas. O tempo necessário para ocorrer 50% de mortalidade dos indivíduos sob exposição permanente do ar é igual ou inferior a metade do tempo sob condições de saturação de umidade.

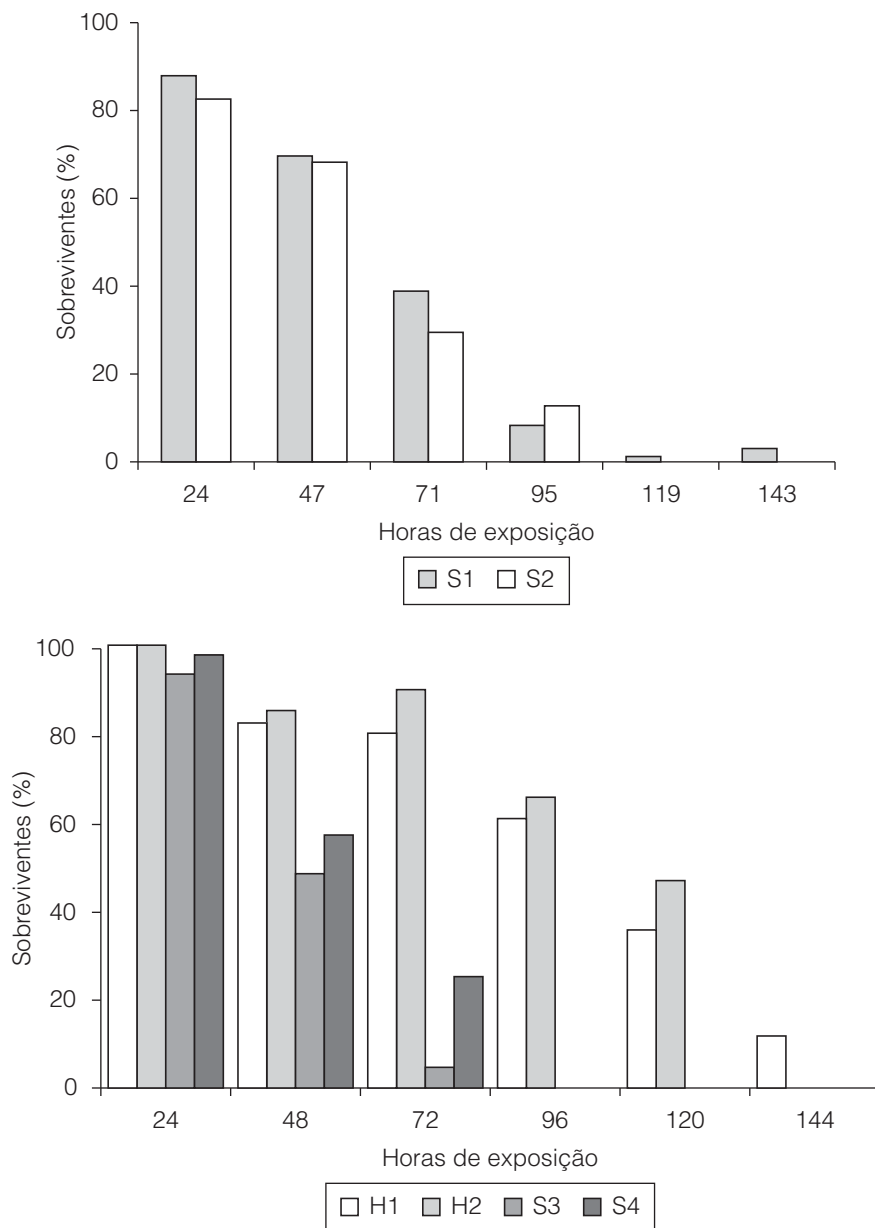


Figura 5. Porcentagem de indivíduos sobreviventes segundo as horas de exposição para as duas experiências realizadas. S1 a S4: exposição permanente ao ar atmosférico, H1 e H2: umedecido à saturação a cada 24 horas. Dados de Darrigran, Maroñas e Colautti.

A avaliação da mortalidade ao longo do tempo, por categorias de tamanho, demonstraram que os componentes mais jovens (<10 mm) das populações são menos resistentes sob prolongados períodos de exposição e permanente ao ar atmosférico (Figura 6). Os indivíduos <10 mm apresentaram 100% de mortalidade em 72 horas de exposição, enquanto que os indivíduos > 20 mm, em 96 horas.

Tabela 3. Quantidade de horas necessárias para que os indivíduos permanentemente expostos ao ar (S1 a S4) ou umedecidos diariamente à saturação (H1 e H2) alcancem 50% e 100% de mortalidade.

| Ensaio | Mortalidade 50% (horas) | Mortalidade 100% (horas) |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| S1 | 57 | 119 |
| S2 | 61 | 168 |
| S3 | 47,44 | 96 |
| S4 | 54,82 | 96 |
| H1 | 103,91 | 168 |
| H2 | 110,02 | 144 |

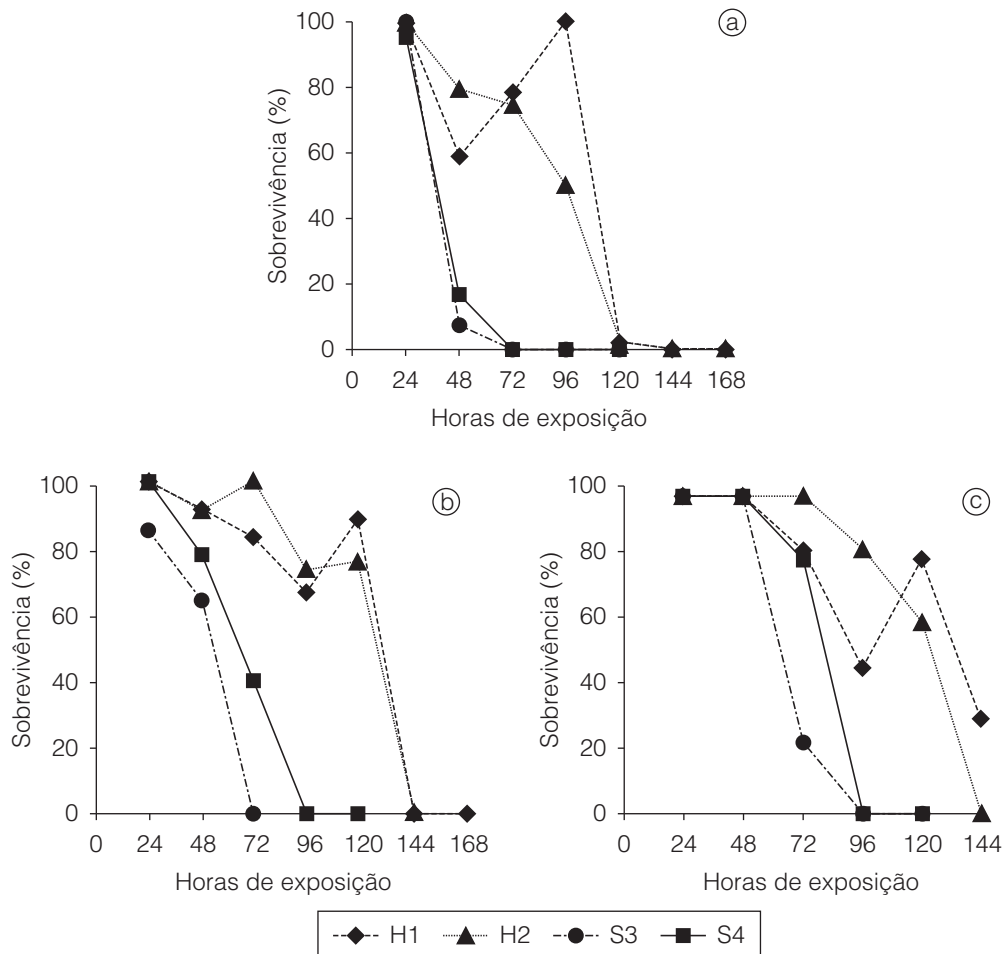


Figura 6. Porcentagem de sobreviventes, por classe de tamanho da segunda experiência, de acordo com exposição permanente ao ar (S3 e S4) ou umedecido à saturação a cada 24 horas (H1 e H2). a: comprimento máximo valvar inferior a 10 mm, b: comprimento máximo entre 10 e 20 mm, c: comprimento máximo maior que 20 mm. Dados inéditos de Darrigran, Maroñas e Colautti.

Darrigran *et al.* (2004) concluem que a exposição ao ar como ferramenta de controle resulta mais eficiente no caso de indivíduos menores que 10 mm de comprimento valvar. Em instalações industriais densamente colonizadas pelo *L. fortunei* a eliminação periódica da água, por lapsos menores que seis dias, não seria suficiente como mecanismo de controle. Para ser efetivo, este método deveria estar acompanhado de procedimentos que reduzam a umidade relativa do ambiente. Desta forma seria possível gerar um estresse capaz de produzir uma mortalidade de 100% dos indivíduos, em intervalos de tempo menores. Deste modo, a complexidade das instalações industriais a tratar impede que esta metodologia possa ser implementada em todos os setores dos sistemas. Contudo, este tratamento representa uma ferramenta complementar às estratégias de controle que visam o tratamento integral de cada ambiente.

A partir dos resultados obtidos, Darrigran *et al.* (2004) concluem que é necessário tomar medidas sanitárias em relação ao transporte por via terrestre de elementos que tenham tido contato com ambientes aquáticos invadidos pelo mexilhão dourado. Sob condições atmosféricas semelhantes às de fim de primavera em relação à temperatura em um clima temperado, mas com uma umidade relativa inferior à média para esta latitude, a espécie demonstrou a capacidade de resistir até seis dias de exposição ao ar. Isto determina que possa ser transportada até outros ambientes ou bacias, aderidas por seus bisos em embarcações, redes e equipamentos de pesca, entre outros, expandindo não apenas sua distribuição geográfica, mas também, os prejuízos ambientais e econômicos que esta dispersão envolve. Esta hipótese, sustentada a partir dos estudos da forma de dispersão do *Dreissena polymorpha* no Hemisfério Norte (Nalepa & Schloesser, 1993), representa uma via alternativa para explicar a rápida dispersão do mexilhão dourado, à contracorrente, na América do Sul (Darrigran, 2000; Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000; Darrigran *et al.*, 2000). Este fato, que provoca sua ampla distribuição atual, favorecerá e potencializará sua dispersão futura.

Montalto e Ezcurra de Drago (2003) avaliaram o tempo de tolerância à dessecação, também em laboratório, aonde simularam um sistema de tubulações. Os exemplares que utilizaram foram coletados nos Rios Santa Fé, Salado do Norte e no Paraná Inferior na altura da cidade de Rosário (Santa Fé, Argentina). No laboratório foram mantidos em aquários com água de rio aerada e alimentados com cultivos de algas (*Selenastrum capricornutum*). Os indivíduos que utilizaram nas experiências foram classificados em três classes a partir de seu comprimento máximo valvar: Os recrutas (< 6 mm), adultos médios (> 6-15mm) e os adultos maiores (> 15-27 mm). Os autores agruparam 20 indivíduos por experimento e fizeram entre 3 a 5 réplicas, sempre usando um grupo como controle. No microambiente controle mediram o pH, a temperatura, o teor de oxigênio, a temperatura ambiente e o porcentagem de umidade relativa. Todas as experiências foram controladas a cada 12 horas, e se realizaram registros de indivíduos vivos e mortos. Conjuntamente, controlaram o tempo de recuperação dos organismos já que, depois de cada experiência, tanto para as de laboratório como para as de campo, agregaram água no vaso de experimentação e controlaram o tempo que tardaram os primeiros organismos em mostrar sinais de recuperação. As unidades experimentais e o controle usado fora do laboratório foram colocados em um dispositivo especialmente projetado e fixado ao solo; para proteger de possíveis predadores se utilizou uma tela metálica e, para a chuva, uma tela plástica. Estes autores também realizaram uma análise das mudanças no nível da água do Rio Paraná para examinar os efeitos dos períodos de águas baixas sobre as populações de *L. fortunei*.

Como nas experiências realizadas por outros autores, seus resultados mostraram que existe uma tendência a que os mexilhões maiores tolerem melhor a dessecação que os menores (Tabela 4). Cabe destacar que os grupos controles mostraram 100% de sobrevivência para todos os tamanhos.

O tempo mínimo para a recuperação dos espécimes classificados como juvenis foi o mesmo, tanto para os que se mantiveram no laboratório como para os submetidos a condições de campo

Tabela 4. Quantidade de horas necessárias para que os indivíduos de distintas classes de alturas alcancem 100% de mortalidade e faixa de condições ambientais a que estiveram expostos. Modificado de Montalto & Ezcurra de Drago, 2003.

| | Mortalidade 100% | |
|----------------------|----------------------|-----------|
| | Laboratório | Campo |
| Juvenis | 72 | 72 |
| Adulto médio | 192 | 96 |
| Adulto maior | 276 | 108 |
| | Condições ambientais | |
| Temperatura (°C) | 9,1-16,5 | 15,3-16,6 |
| Umidade Relativa (%) | 63,4-78,4 | 65-93 |

(entre 10 e 15 minutos). Os indivíduos classificados como adultos médios e maiores que foram mantidos em condições de laboratório se recuperaram mais rapidamente que os expostos à intempérie.

Como se pode observar na Tabela 4, o mexilhão dourado tolerou melhor a dessecação em condições de laboratório. Montalto e Ezcurra de Drago (2003) concluíram que este fato estaria associado à menor variação na temperatura e na umidade relativa reinantes nas condições de laboratório. No exterior, ao existir uma maior variação em os ambos os fatores, se produziria um maior estresse. As experiências foram realizadas no outono/inverno, pelo que os autores concluíram que o tempo de tolerância à dessecação no campo durante a primavera/verão, com temperatura mais alta e com maior número de horas de sol, deveria reduzir-se.

A interpretação dos resultados obtidos por Montalto e Ezcurra de Drago (2003) no campo é de sumo interesse no que concerne às populações do mexilhão dourado que coloniza a zona do sistema Rio Paraná. Na planície de inundação deste rio as populações de *L. fortunei* estão sujeitas a pulsos de cheia. Durante o período de águas altas esta espécie pode colonizar a zona de transição água - terra, enquanto que durante a fase de águas baixas os indivíduos estão sujeitos a condições de dessecação. Os resultados que obtiveram no campo lhes permitem assumir que, com um período extenso de águas baixas, a população de *L. fortunei* poderia decrescer naturalmente com um tempo de exposição de ao menos 96 horas.

Iwasaki (1997) encontrou que os indivíduos de *L. fortunei* maiores que 20 mm sobreviviam até 10 dias, enquanto que os registros máximos de sobrevivência de Darrigran *et al.* (2004) não superaram os 7 dias, apesar de não ter usado rosetas. Apesar de que, em ambos os estudos, houve coincidência na temperatura, a diferença na sobrevivência se deveria a que as experiências dos últimos autores se fizeram em uma atmosfera mais dessecante: 49-63% de umidade relativa ambiente contra 72-81% utilizada nos ensaios de Iwasaki (1997). Os resultados obtidos por Montalto e Ezcurra de Drago (2003), em relação aos ensaios realizados em laboratório, são coincidentes com as observações já mencionadas, e confirmam que a sobrevivência do mexilhão dourado está ligada à temperatura. De todos os ensaios, estes últimos foram os que se realizaram às mais baixas temperaturas e os que apresentaram a maior sobrevivência.

As experiências realizadas por Darrigran *et al.* (2004), nas quais se aumentou periodicamente a umidade até o ponto de saturação (H1 e H2), incrementaram notavelmente a sobrevivência em função do tempo, comparados com a exposição permanente ao ar. Esta resposta teria relação com a capacidade da espécie para viver em zonas de intermarés, aonde a imersão e exposição são partes do ciclo de vida diário.

REFERÊNCIAS

- Cataldo, D., D. Boltovskoy & M. Pose. 2003. Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. *Journal Awwa* 95: 66-76.
- Claudi, R. & G. L. Mackie. 1994. *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. Lewis Publishers, Boca Ratón, 227 pp.
- Darrigran, G. A. 1997. Invasores en la cuenca del Plata. *Ciencia Hoy* 7(38): 17-22.
- Darrigran, G. 2000. Invasive Freshwater Bivalves of the Neotropical Region. *Dreissena* 11(2): 7-13.
- Darrigran, G. & M. C. Damborenea. 2001. Concentrações letais de un biocida para adultos del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae). *ACTAS Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental e Hidroelectricidad*: 25-32. Salto Grande. Argentina.
- Darrigran, G. & I. Ezcurra de Drago. 2000. Invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in America. *Nautilus* 2: 69-74.
- Darrigran, G., P. Penchaszadeh & C. Damborenea. 2000. An invasion tale: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) in the Neotropics. R. Claudi (ed.) *Proceeding 10th International Aquatic Nuisance Species and Zebra-Mussels Conference*. Toronto. Canadá: 219-224.
- Darrigran, G. A., M. E. Maroñas & D. C. Colautti. 2001. Primeras estimaciones de concentrações letais de un biocida para el molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae). *ACTAS Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental y Hidroelectricidad*: 131-134.
- Darrigran, G. A., M. E. Maroñas & D. C. Colautti. 2004. Air exposure as a control mechanism for the golden mussel, *Limnoperna fortunei*, (Bivalvia: Mytilidae). *J. Freshwater Ecology* 19(3): 461-464.
- Darrigran, G. A., D. C. Colautti & M. E. Maroñas (Manuscrito). Acute toxicity test in larval stage of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) under experimental conditions.
- De Kock, W. C. & C. T. Bowmer. 1993. Bioaccumulation, biological effects and food chain transfers of contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*. Lewis Publications.
- Griffiths, R.W., D. W. Schloesser; J. H. Leach & W. P. Kovalak. 1991. Distribution and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Great Lakes region. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1381-1388.
- Iwasaki, K. 1997. Climbing behaviour and tolerance to aerial exposure of freshwater mussel, *Limnoperna fortunei*. *Venus* 56 (1): 15-25.
- Mansur, M. C. D., L. M. Z. Richinitti & C. P. dos Santos. 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, Porto Alegre 7 (2):147-149.
- Martin, I. D., G. L. Mackie & M. A. Baker. 1993. Acute toxicity test and pulsed-dose doayed mortality at 12 and 22°C in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 389-398.
- McMahon, R. F., B. N. Shipman & D. P. Long. 1993. Laboratory efficacies of nonoxidizing molluscicides on the zebra mussel (*Dreissena polimorpha*) and the asian clam (*Corbicula fluminea*). In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*, pp. 575 - 598. Lewis Publications.
- Montalto, L. & I. Ezcurra de Drago. 2003. Tolerance to desiccation of an invasive mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae), under experimental conditions. *Hydrobiologia* 498: 161-167.
- Montalto, L. & M. Marchese. 2003. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) tolerance to temperature and pH in experimental conditions. *Neotropica* 49: 26-34.
- Morton, B. S., C. S. Au & W. W. Lam. 1976. Control of *Limnoperna fortunei*. *Jour. Inst. Water Eng. & Sci.* 30: 147-156
- Nalepa, T. & W. Schloesser. 1993. *Zebra mussels: biology, impacts, and control*. Lewis Publisher, Boca Ratón, 508 pp.
- Ricciardi, A.; R. Serrouya & F. G. Whoriskey. 1994. Aerial exposure tolerance of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae): implications for overland dispersal. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 470-477.
- Van Benschoten, J. E., J. N. Jensen, D. Lewis & T. J. Brady. 1993. Chemical oxidants for controlling zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a synthesis of recent laboratory and field studies. In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*, pp. 599 - 620. Lewis Publication.

