



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

Introdução

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintéticos adaptados a uma vasta gama de condições ambientais e tolerantes a inúmeras situações de stress. Nos ecossistemas aquáticos fazem parte não só da comunidade fitoplanctónica mas também da comunidade bentónica que coloniza as margens. Dependendo das condições ambientais, a dinâmica destes organismos pode resultar no seu desenvolvimento em elevadas densidades, sendo este fenómeno descrito como florescência ou bloom. O aumento da carga de nutrientes em resultado das actividades humanas tem sido apontado como uma das causas para o desenvolvimento de blooms. Nos últimos anos, os blooms de cianobactérias têm sido um fenómeno cada vez mais descrito quer em termos de frequência, intensidade e distribuição geográfica e tem-se concluído por estudos recentes que a sua proliferação generalizada está também relacionada com as alterações climáticas. As cianobactérias proliferam a elevadas temperaturas, especialmente em águas ricas em nutrientes. O aquecimento global cria condições favoráveis para o seu desenvolvimento uma vez que estes organismos parecem responder melhor ao aumento da temperatura que a maior parte das outras espécies algais.

O estudo das cianobactérias tem-se revelado de extrema importância uma vez que estes organismos produzem compostos tóxicos com efeitos severos a nível do sistema nervoso e a nível de órgãos como o fígado e o intestino. Em vários países foram descritos casos de morte de animais selvagens e domésticos por consumo de água contaminada com toxinas de cianobactérias e casos de dermatites, diarreias e reacções alérgicas em humanos após contacto com água contaminada em locais usados para fins recreativos. Assim, o desenvolvimento de cianobactérias tem sido considerado uma ameaça não só em termos de equilíbrio dos ecossistemas mas também em termos de saúde pública.

Além da capacidade de produzirem compostos tóxicos os blooms de cianobactérias, assim como o de qualquer outro grupo fitoplanctónico, traz consequências nefastas para o ecossistema uma vez que a acumulação de grandes densidades fitoplanctónicas à superfície da água leva a uma perda da transparência, impede a penetração da luz nas camadas inferiores e leva à exaustão dos nutrientes. O declínio de uma florescência é por sua vez acompanhado de um aumento da degradação da matéria orgânica com consequente gasto do oxigénio dissolvido e acumulação de compostos tóxicos como a



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

amónia. A depleção de oxigénio na água é muitas vezes acompanhada por mortandades de peixes e outra fauna aquática.

A Ecotoxicologia é uma ciência que se baseia na realização de experiências e que utiliza variadíssimos organismos como modelos. Para além da avaliação dos efeitos dos tóxicos nos organismos dos ecossistemas, usa também o pressuposto de que os efeitos adversos causados nos vários organismos e no Homem podem ser semelhantes. Esta extrapolação da toxicidade tem que ser no entanto muito cautelosa. Actualmente em estudos toxicológicos, existem muitas alternativas aos ensaios com mamíferos entre os quais se destacam a utilização de testes com algas do fitoplâncton, invertebrados do zooplâncton, bactérias, peixes, até estudos *in vitro* em que se estudam os efeitos da toxicidade usando linhas celulares.

Dado o interesse que a problemática da ocorrência de blooms de cianobactérias tóxicas tem suscitado não só na comunidade científica e nas entidades responsáveis pela área da saúde pública como também no público em geral e no sentido de sensibilizar para as consequências da sua ocorrência, pretendemos com este desafio que possas avaliar o potencial tóxico de uma estirpe de cianobactéria face a organismos de dois níveis tróficos de um ecossistema aquático.

Assim propomos a avaliação da toxicidade de uma estirpe de cianobactéria face a outra microalga (produtor primário) e face a um organismo zooplancónico (consumidor primário). A estirpe de cianobactéria escolhida pertence à espécie *Microcystis aeruginosa* uma vez que esta espécie se apresenta largamente difundida por todos os ecossistemas aquáticos, sendo apontada como produtora de vários tipos de toxinas. Dentro das toxinas produzidas, as de maior impacto são as microcistinas, cujo órgão alvo em mamíferos é o fígado, estando também descritos casos de intoxicações em peixes, aves e invertebrados. A espécie com que propomos trabalhar é produtora de microcistinas, nomeadamente da variante mais comum que é a microcistina LR.

Este trabalho apresenta 3 etapas, que podem ser independentes em termos de execução:

1. Efectuar uma cultura laboratorial de uma estirpe de cianobactéria da espécie *Microcystis aeruginosa* com o objectivo de determinar a sua curva de crescimento.
2. Avaliar a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* num teste de toxicidade aguda com uma microalga verde: Inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris*.
3. Avaliar a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* num ensaio com náuplios de um crustáceo zooplancónico: Indução de mortalidade de náuplios de *Artemia salina*.



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

O Kit contém:

Material

1 câmara de contagem de Neubauer

1 placa com 24 poços de 3mL

3 pipetas Pasteur de plástico

Soluções

1 tubo com 2 mL de solução de lugol

4 tubos com as soluções para o meio Z8:

Solução A - 40 mL

Solução B - 40 mL

Solução FeEDTA - 40 mL

Solução micronutrientes - 4 mL (enviado em 2 tubos de 2mL cada)

Material vivo

1 tubo com quistos *Artemia*

1 tubo com suspensão concentrada de células *Microcystis aeruginosa* (inóculo *Microcystis*)

1 tubo com suspensão concentrada de células *Chlorella vulgaris* (inóculo *Chlorella*)

Extractos tóxicos

1 tubo com extracto congelado de *Microcystis* (para usar no ensaio toxicidade com *Chlorella*)

1 tubo com extracto evaporado de *Microcystis* (para usar no ensaio toxicidade com *Artemia*)



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

Material que necessita ter na escola:

Microscópio óptico

Lupa

Bomba de arejamento de aquário

Tubo plástico - para ligar a bomba e colocar a cultura de *Microcystis* com arejamento

Sal cozinha ou sais marinhos (adquirem-se em lojas de aquarofilia)

Garrafa/frasco de 1 L

Garrafão de 5L (podem usar garrafões de água)

Água destilada ou água mineral engarrafada (5 L)

Película aderente

Algodão e gaze (para fazer rolha)

Papel filtro

Candeeiro



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

Aplicação dos materiais

Material	Função	Cultura <i>Microcystis</i>	EnsaioTox <i>Chlorella</i>	Ensaio Tox <i>Artemia</i>
Microscópio óptico	<ul style="list-style-type: none">Observar os organismosContar as células na câmara de Neubauer	X	X	
Lupa	<ul style="list-style-type: none">Observar Artemia			X
Bomba aquário	<ul style="list-style-type: none">Arejamento da água para eclosão ArtemiaArejamento da cultura <i>Microcystis</i>	X		X
Câmara Neubauer	<ul style="list-style-type: none">Contagem das células	X	X	
Tubo plástico para arejamento (TUBO PVC)	<ul style="list-style-type: none">Conduz o ar desde a bomba de aquário até as culturas	X		X
Placa poços 3ml	<ul style="list-style-type: none">Realização dos ensaios		X	X
Pipetas plástico	<ul style="list-style-type: none">Manuseamento dos organismosPipetar as soluções		X	X
Garrafa/frasco 1L	<ul style="list-style-type: none">Usar com 800 ml de água salgada para eclosão dos quistos de Artemia			X
Garrafa/frasco 5L (GARRAFÃO ÁGUA)	<ul style="list-style-type: none">Usar com 3 L de meio Z8 para fazer a cultura de <i>Microcystis</i>	X	X	
Soluções do Meio Z8	<ul style="list-style-type: none">Preparar 4 L de meio Z8	X	X	X
Lugol	<ul style="list-style-type: none">Fixar as células para depois contar na câmara Neubauer	X	X	X
Sal cozinha ou sais marinhos	<ul style="list-style-type: none">Usar 10 a 15g de sal por 0,5 l da águapreparar água salgada para eclosão Artemia (800 mL) e para as soluções do ensaio toxicidade com Artemia			X
Inóculo de células <i>Microcystis</i>	<ul style="list-style-type: none">Iniciar a cultura de <i>Microcystis</i>	X		
Inóculo de células <i>Chlorella</i>	<ul style="list-style-type: none">Usar como organismo teste no ensaio toxicidade		X	
Quistos Artémia	<ul style="list-style-type: none">Depois da eclosão usar os nauplios como organismo teste			X
Extracto congelado <i>Microcystis</i>	<ul style="list-style-type: none">Congelar/descongelar e usar como solução tóxica no ensaio com <i>Chlorella</i>		X	
Extracto evaporado <i>Microcystis</i>	<ul style="list-style-type: none">Ressuspender em água salgada e usar como solução tóxica no ensaio com artemia			X



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

Por que ordem começar.

Resumo

1. Comece por ler atentamente estes protocolos de trabalho.
2. Ao abrir o kit identifique atentamente o seu conteúdo.
3. Deve começar por iniciar a cultura de *Microcystis* e por realizar o ensaio de toxicidade com *Chlorella* dado que o material enviado no Kit pode degradar-se. O ensaio toxicidade com *Artemia* pode ser realizado em qualquer altura.
4. No caso de não iniciar no próprio dia guarde as soluções no frigorífico, o extracto congelado no congelador e o extracto evaporado no frigorífico, os tubos com as algas vivas em zona com luz. Os quistos de artémia guardam-se ao abrigo da luz em lugar seco.
5. Os testes com *Chlorella* e o início da cultura convém efectuar no prazo de 2 dias.

Resolveu meter mãos à obra?

1. Comece por preparar o meio Z8

MEIO DE CULTURA Z8

Um dos meios usados na cultura de microalgas é o meio Z8, composto por uma solução rica em azoto (solução A), uma solução rica em fósforo (solução B), uma solução de ferro (solução de Fe-EDTA) e uma solução de micronutrientes.

- a. Limpe a bancada com álcool a 70% e acenda as lamparinas. Sempre que possível todos os procedimentos devem ser realizados em condições de esterilidade, de forma a evitar contaminações.
- b. Adicione a 4l de água destilada, no garrafão de 5L, o conteúdo dos 4 tubos com as soluções para meio Z8. Agite bem.
- c. Retire 1 L para uma garrafa ou frasco esterilizado ou, não sendo possível esterilizar, bem lavado e reserve para o teste com *Chlorella*

2. Inicie a cultura de *Microcystis*

- a. Nos 3 L de meio Z8 que ficaram no garrafão junte o conteúdo do tubo “inóculo células *Microcystis*”. Agite bem para que as células fiquem uniformemente distribuídas no meio.



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

- b. Retire um pequeno volume (1 ou 2 ml) da cultura bem homogeneizada para um tubo de vidro ou plástico. Adicione 1 ou 2 gotas de lugol de forma a fixar as células.
- c. Coloque a rolha com o tubo de arejamento no garrafão. Identifique a cultura com a cianobactéria usada, o meio de cultura e o seu volume, a data de início da cultura, fotoperíodo e temperatura ambiente.
- d. Ligue ao arejamento com a bomba de aquário e o tubo de arejamento. Verifique que fica a borbulhar e que as cianobactérias não se depositam no fundo.
- e. Coloque num local bem iluminado ou junto de um candeeiro, temperatura de 20-25°.
- f. Atenção às baixas temperaturas, podem limitar o crescimento.
- g. Se possuir um local interior com temperatura mais estável, coloque junto uma fonte de luz.
- h. A partir das células de *Microcystis aeruginosa* fixadas (em b.) determine a densidade celular por quantificação na câmara de Neubauer. O valor obtido corresponde a densidade celular inicial. Expresse os valores em células/ mL.

Determinação da curva de crescimento de *Microcystis aeruginosa*

- i. Diariamente e se possível na mesma altura do dia, retire 1 ou 2 mL da cultura (agitar bem antes de retirar a amostra) e fixe com 1 ou 2 gotas de lugol. Quantifique na câmara de Neubauer.
- j. Vá registando os valores da densidade celular e construa um gráfico com a densidade celular (células/mL) em função do tempo (dias).

3. Realize o ensaio toxicidade com *Chlorella*

Avaliação da toxicidade de *M. aeruginosa* num ensaio com *Chlorella vulgaris*

Os ensaios de toxicidade são realizados com organismos considerados representativos de um determinado nível trófico, fáceis de manter em laboratório e de manipular. As microalgas são utilizadas como representativas do primeiro nível trófico da cadeia alimentar.

- a. Prepare o extracto de *Microcystis aeruginosa* a testar:
- b. No tubo com o extracto congelado de *Microcystis aeruginosa* adicione meio Z8 até 40 mL. Agite bem. A esta suspensão corresponde uma concentração celular de $1,45 \times 10^7$ cél/mL.
- c. Congele e descongele duas ou três vezes de forma a rebentar as células.
- d. Verifique ao microscópio se as células rebentaram. Quando rebentam deixa de ver células intactas e surgem pequenos fragmentos que por vezes são difíceis de observar.

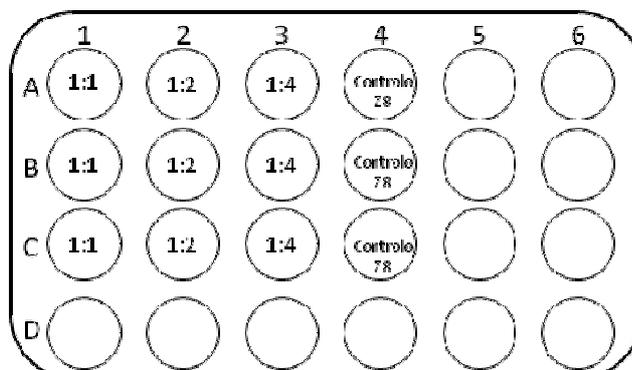


SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

- e. Com papel de filtro ou filtros de café filtre a solução obtida. Recolha o filtrado.
- f. Prepare as soluções de tóxico: (1:1)- filtrado sem ser diluído; filtrado diluído (1:2) e (1:4)

Solução tóxico	Filtrado (mL)	Meio Z8 (mL)
1:1	2	-
1:2	1	1
1:4	0,5	1,5
Controlo	-	2

- g. Na placa de 24 poços adicione o filtrado sem ser diluído (1:1) e diluído 1:2 e 1:4 de acordo com a figura. Em cada poço adicione 2 mL da solução a testar. As diluições são feitas com meio Z8. O controlo é também constituído por meio Z8.
- h. Faça três réplicas para cada concentração.





SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

- i. Prepare o inóculo de *Chlorella vulgaris*:
- j. Retire 2 ml do inóculo de *Chlorella vulgaris* fornecido, fixe com 1 gota de lugol e quantifique a densidade de células na câmara de Neubauer.
- k. Conhecida a concentração de células no inóculo fazer uma diluição com meio Z8 para que, adicionando a cada poço 0,5 ml de inóculo de *Chlorella*, obtenha uma concentração inicial de $1 \cdot 10^6$ cél/ml.
- l. Adicione a cada poço com o extracto de cianobactéria, 0,5 ml do inóculo de *Chlorella vulgaris* preparado.
- m. Tape a placa com a tampa e vede com parafilme ou envolva em película aderente transparente para evitar evaporação.
- n. Coloque em local iluminado (pode ser junto da cultura de *Microcystis aeruginosa*) durante 48 horas em constante agitação. Se não se dispuser de um agitador automático agitar manualmente a placa três vezes por dia (com a placa pousada em cima da mesa, fazer movimentos circulares com cuidado para não verter).
- o. Ao fim das 48 horas de exposição termine o teste fixando as algas com 1 gota de lugol.
- p. Para ressuspender bem as algas e homogeneizar bem as soluções, com uma pipeta injectar várias vezes ar em cada poço. Cuidado para não verter!
- q. Determine a concentração de algas em cada poço, por contagem do número de células na câmara de Neubauer (**não esquecer de homogeneizar bem as soluções!!!!**).
- r. Após contagem do número de células calcule a percentagem de inibição (% I) para cada uma das concentrações da seguinte forma:

$$\% I = 100 - ((\text{valor médio cél/ml das réplicas de cada diluição} / \text{valor médio cél/ml das réplicas do controlo})) \times 100$$

- s. Construa um gráfico onde se representa a percentagem de inibição em função da concentração celular.



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

4. Realize o ensaio toxicidade com Artemia

Avaliação da toxicidade de *M. aeruginosa* em náuplios de *Artemia*

O objectivo deste teste é determinar a toxicidade de *Microcystis aeruginosa* face a náuplios de *Artemia salina*. Para este teste foi enviado um extracto evaporado de *Microcystis* obtido por ruptura das células por ultra-sons e numa solução de 80% de metanol.

- a. **Obtenção dos náuplios de artémia:**
- b. Num frasco de vidro de boca larga (por exemplo os frascos grandes de cevada) coloque 1 L de água da torneira e deixe a arejar durante algumas horas de modo a que sejam removidos vestígios de cloro. Pode em alternativa utilizar 1L de água mineral.
- c. Adicione a cada 1 Litro de água 20-30 g de sal de cozinha (2 colher de chá bem cheia) ou os sais marinhos (preparar de acordo com as instruções que acompanham a embalagem). Dissolva bem. Retire para um frasco bem lavado 100 mL desta solução e reserve.
- d. Coloque nos 900 mL de água salgada preparada os quistos de artémia fornecidos. Mantenha a cerca de 25 °C com iluminação contínua (pode utilizar um pequeno candeeiro) e arejamento forte e contínuo (pode durante este período de tempo usar a bomba da cultura de *Microcystis aeruginosa* caso não tenha duas bombas).
- e. Com temperaturas de 25°C e forte ventilação com borbulhas grandes, os náuplios saem dos ovos dentro de aproximadamente 24-36 horas. Esta evolução é mais lenta para temperaturas mais baixas. O arejamento é indispensável e garante o abastecimento de oxigénio.
- f. Quando os náuplios surgirem (\pm após 24 horas), desligue o arejamento, os náuplios juntam-se no fundo do frasco e os invólucros dos ovos ficam à superfície.
- g. Retire os náuplios, para não ficarem privados de oxigénio, com uma pipeta para um pequeno volume de água salgada (10-15 mL). Convém que os náuplios fiquem bem concentrados. Em número suficiente á realização do ensaio.
- h. **Preparar o extracto de Microcystis:**

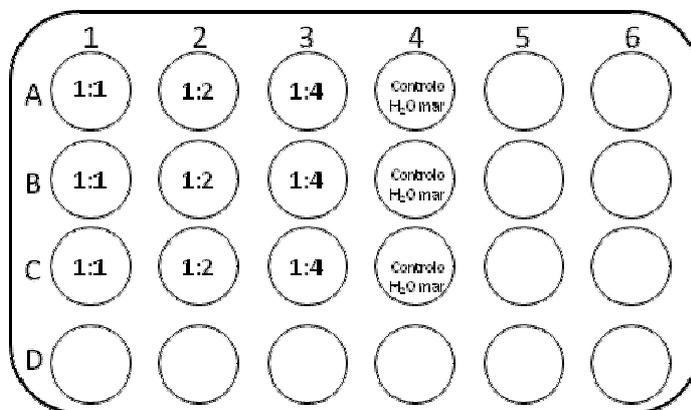


SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

- i. Ressuspender o extracto evaporado de *Microcystis* fornecido no kit em 12 ml de água salgada. Agitar vigorosamente até misturar homogeneamente. A esta suspensão corresponde uma concentração de células de $5,48 \times 10^7$ cél./mL
- j. Prepare as soluções de tóxico: (1:1)- sem ser diluído; diluído (1:2) e (1:4) usar a água salgada para diluir. O controlo é também constituído por água salgada.

Solução tóxico	Extracto (mL)	Água mar (mL)
1:1	2	-
1:2	1	1
1:4	0,5	1,5
Controlo	-	2

- k. Na placa de 24 poços adicione as soluções sem ser diluído (1:1) e diluído 1:2 e 1:4 de acordo com a figura. Em cada poço adicione 2 mL da solução a testar.
- l. Faça três réplicas para cada concentração.



- m. Adicione a cada poço 0,5 mL de “suspensão de nauplios de artémia” de forma a colocar cerca de 10-15 nauplios em cada poço
- n. Tape as placas e vede com película aderente, para evitar a evaporação, envolver em papel de alumínio e deixar a incubar a 25°C.
- o. Ao fim de 24 horas, à lupa, contar o número de artémias mortas em cada poço (não as remover). As larvas são consideradas mortas se não se observar qualquer movimento num período de 30 segundos.
- p. Voltar a tapar as placas e deixar por mais 24 horas.
- q. Ao fim de 48 horas contar o número de artémias mortas em cada poço.



SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?

- r. No final das contagens fixar com 1-2 gotas de lugol e contar o número total de larvas por poço.
- s. Calcular a percentagem de artémias mortas em cada poço. Para cada concentração calcular a média e o desvio padrão.
- t. Representar graficamente a percentagem de mortalidade em função da concentração de solução tóxica de Microcystis.