

E SE UM BLOOM DE CIANOBACTÉRIAS TE BATESSE À PORTA?



Com a colaboração de:

Piedade Barros

Maria do Rosário Martins

**Escola Superior Tecnologias
da Saúde do Porto - Porto**



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

TRABALHOS

Efectuar uma cultura laboratorial de uma estirpe de cianobactéria da espécie *Microcystis aeruginosa* determinando a sua curva de crescimento.

Avaliar a toxicidade da cianobactéria num teste de toxicidade aguda com uma microalga verde: Inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris*.

Avaliar a toxicidade da cianobactéria num ensaio com náuplios de um crustáceo zooplanctónico: Indução de mortalidade de náuplios de *Artemia salina*.



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

MATERIAL a receber

- Câmara de Neubauer
- Meio de cultura Z8
- Lugol (fixação)
- Inóculo de *Microcystis aeruginosa* e *Chlorella vulgaris*
- Concentrado e Extracto de *Microcystis* (para testes de toxicidade)
- Quistos de *Artemia salina*
- Pipetas Pasteur descartáveis

Outro MATERIAL necessário

- Microscópio óptico
- Lupa
- Bomba aquário
- Sal cozinha ou sais marinhos
- Tubo plástico para arejamento
- Placa poços 3ml / tubos de ensaio
- Garrafa / frasco 1L e 5L
- Fracos pequenos



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

MEIO DE CULTURA

Cianobactéria +
alga verde



Sp água doce



Meio Z8

Artémia



Sp Água salgada



Água salgada



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

MEIO DE CULTURA

Cianobactéria +
alga verde



Sp água doce



Meio Z8



Fonte de azoto
(Sol. A – 10 ml/l)

Fonte de fósforo
(Sol. B – 10 ml/l)

Fonte de Ferro
(Sol. Fe-EDTA – 10 ml/l)

Fonte de micronutrientes
(Sol. Micronutrientes – 1 ml/l)



3 litros para cianobactéria

1 litro para alga verde



4 litros água destilada / mineral



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

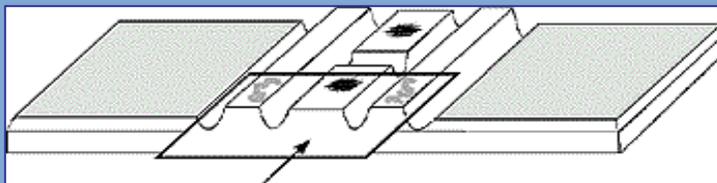
QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON

Quantificar o número de células num volume conhecido - câmaras de contagem de Neubauer

Possuem duas zonas de contagem separadas por um sulco horizontal e limitadas de cada lado por um canal vertical

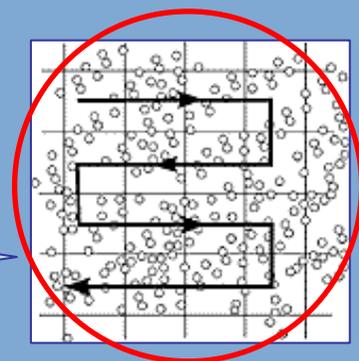
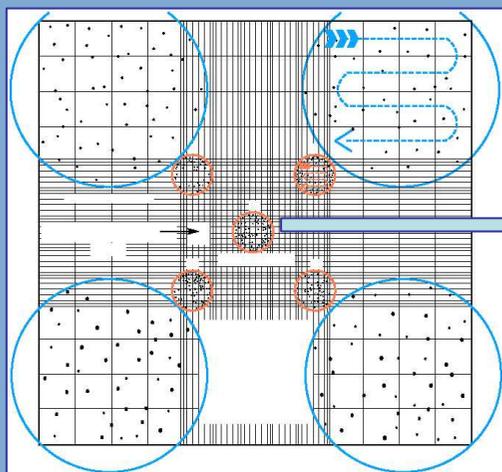


Volume = 4×10^{-6} ml

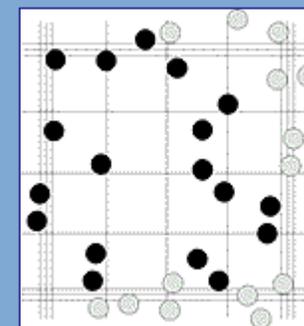


E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON



volume de 4×10^{-6} ml

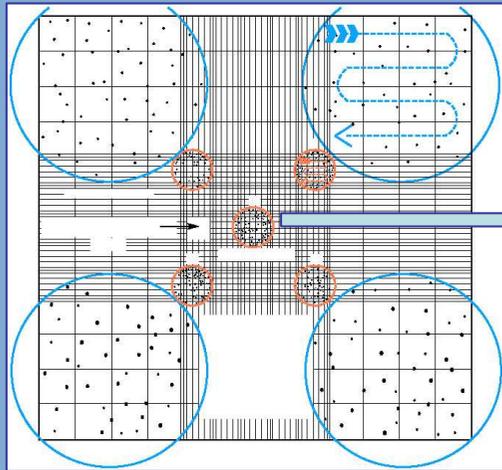


Local de quantificação de baixas densidades celulares (a azul) e densidades mais elevadas (vermelho)



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

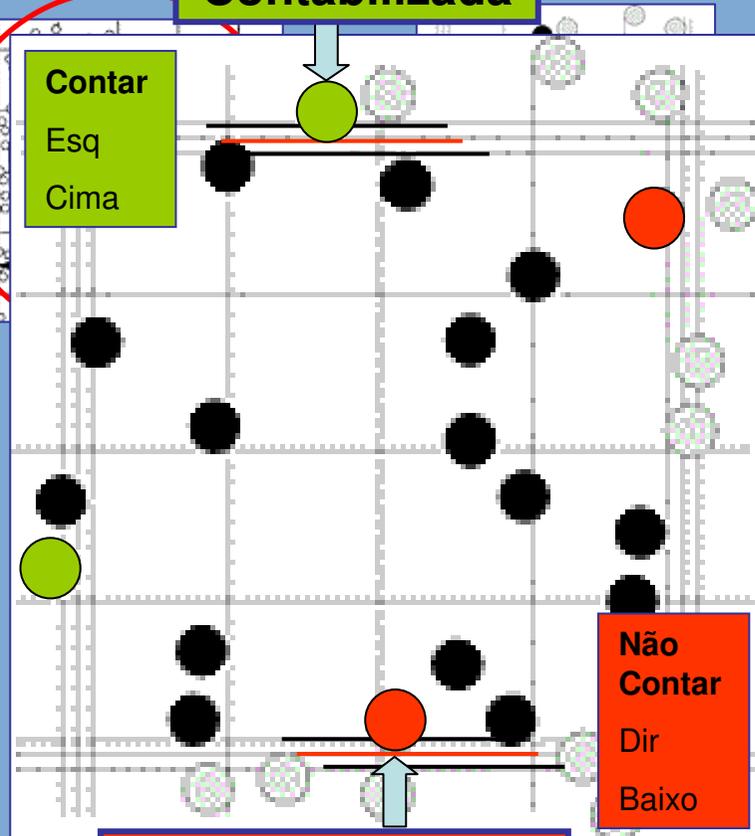
QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON



Local de quantificação de baixas densidades celulares (a azul) e densidades mais elevadas (vermelho)

Contabilizada

Contar
Esq
Cima

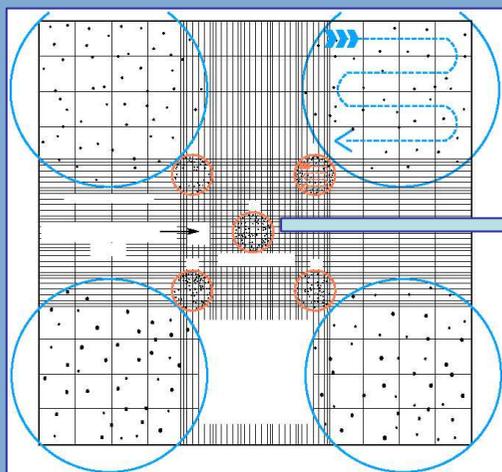


Não contabilizada

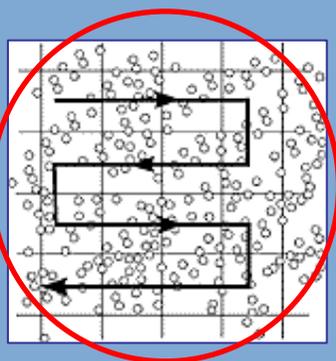


E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

QUANTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON

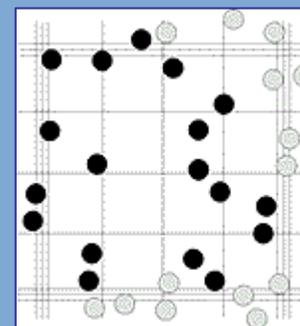


Local de quantificação de baixas densidades celulares (a azul) e densidades mais elevadas (vermelho)



Fixar as células com 1 ou 2 gotas de lugol.

Finalidade: imobilizar as células e torná-las mais pesadas sendo mais rápida a sua sedimentação.



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

1. Efectuar uma cultura laboratorial de *Microcystis aeruginosa*

A. Início da cultura da cianobactéria a partir do inóculo fornecido

- Adicionar o inóculo de *Microcystis aeruginosa* fornecido a 3 L de meio Z8
- Retirar 2 ou 3 mL, fixar com lugol e calcular a concentração inicial em câmara de Neubauer
- Colocar uma rolha de gaze e algodão com o tubo de arejamento no garrafão e ligar a bomba de arejamento



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

1. Efectuar uma cultura laboratorial de *Microcystis aeruginosa*

B. Determinação da curva de crescimento

Procedimento prático

- Anotar a concentração celular no dia do início da cultura.
- De 24 em 24 horas retirar 1 a 2 ml de cultura e fixar com uma gota de lugol. Este procedimento permite, além de imobilizar as células, preservar a amostra para o caso de não ser quantificada de imediato.
- Determinar a densidade celular em câmara de Neubauer
- Construir um gráfico com a concentração celular em função do tempo
- Cerca de 1 mês

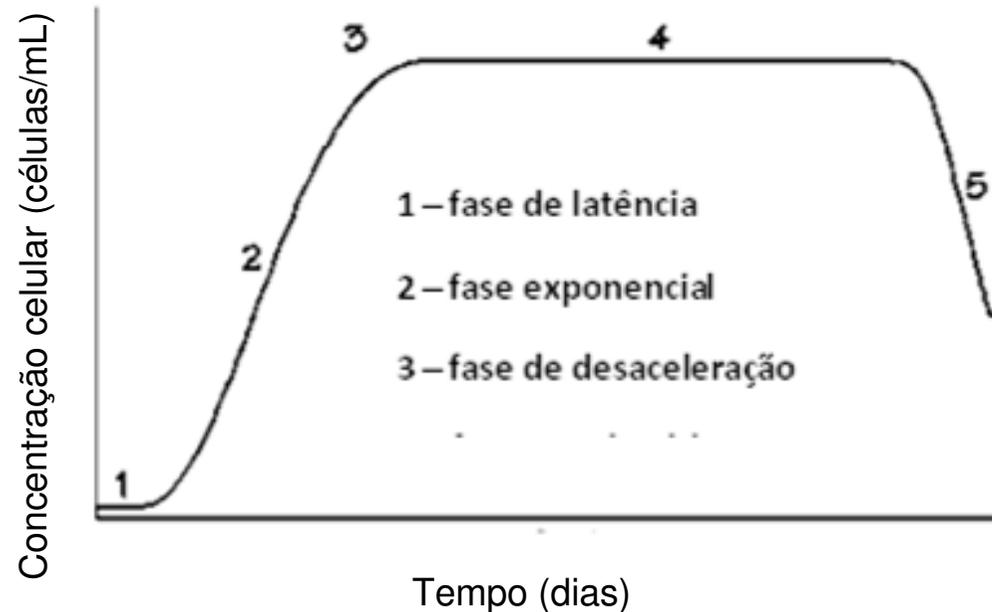


E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

1. Efectuar uma cultura laboratorial de *Microcystis aeruginosa*

B. Determinação da curva de crescimento

Procedimento prático



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

2. Ensaio inibição crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Objectivo: determinar os efeitos tóxicos da cianobactéria no crescimento da microalga

Obtenção do extracto de cianobactéria:

- Adicionar 40 mL de meio Z8 ao concentrado de *Microcystis* fornecido
- Congelar e descongelar de modo a rebentar as células e libertar as toxinas
- Observar ao microscópio se as células rebentaram
- Filtrar com papel de filtro
- Usar o filtrado no teste de toxicidade



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

2. Ensaio inibição crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

	1	2	3	4	5	6
A	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
B	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
C	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
D						

1:1 = 2ml de filtrado de cianobactéria

1:2 = 1 mL de filtrado + 1 mL de meio Z8

1:4 = 0,5 mL de filtrado + 1,5 mL de meio Z8

Controlo = 2 mL de meio Z8

3 réplicas por diluição

Adicionar 0,5 mL de *Chlorella*
(concentração inicial de $1 \cdot 10^6$ cél/mL)

48 horas (agitar três vezes por dia)



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

2. Ensaio inibição crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

	1	2	3	4	5	6
A	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
B	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
C	1:1	1:2	1:4	Controlo Z8		
D						

- Terminar o teste adicionando a cada poço 1 gota de lugol
- Homogeneizar bem as soluções
- Quantificar o número de células em cada poço em câmara de Neubauer
- Calcular a percentagem de inibição (% I)

Gráfico percentagem inibição em função concentração celular.



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

3. A avaliação da toxicidade da cianobactéria num ensaio com *Artemia salina*.

Eclosão dos quistos de *Artemia salina*

1 litro água da torneira + sais marinhos

Adicionar quistos de artémia

25°C, iluminação e arejamento contínuos 24 horas

Separar náuplios para nova água do mar

Concentrar ao máx num peq recipiente

Extracto de cianobactéria – fornecido seco

Adicionar 20 mL da água salgada

Agitar



E se um bloom de cianobactérias te batesse à porta?

3. A avaliação da toxicidade da cianobactéria num ensaio com *Artemia salina*.

	1	2	3	4	5	6
A	1:1	1:2	1:4	Controlo H ₂ O mar		
B	1:1	1:2	1:4	Controlo H ₂ O mar		
C	1:1	1:2	1:4	Controlo H ₂ O mar		
D						

1:1 = 2ml de extracto de cianobactéria e 0,5 ml de suspensão de artémia (10 a 15 indivíduos) ...

Diluições com água salgada
Incubar a 25°C

- Contar as larvas mortas ao fim de 24 horas e 48 horas
- No final fixar com 1 gota de lugol e contar o número total larvas
- Calcular a percentagem de mortalidade (24 e 48 horas)
- Gráfico de percentagem de mortalidade em função da concentração de cianobactéria



