Piedade Aurora Gonçalves de Barros

EFEITOS TÓXICOS DE CIANOBACTÉRIAS EM CLADÓCEROS

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001

Piedade Aurora Gonçalves de Barros

EFEITOS TÓXICOS DE CIANOBACTÉRIAS EM CLADÓCEROS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor em Biologia

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001

À memória de meu pai,
à tia Glória.

Ao Zé,
ao João, à Inês e à Joana.

What is still not clear is how far we need to push standardization and reduce variability in order to obtain ecotoxicologically useful results.

Soares e Calow, 1993

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio e a colaboração de várias pessoas e instituições, às quais quero aqui expressar o meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora M. Leonor Fidalgo, minha orientadora, pelo apoio científico, a disponibilidade, o incentivo e a amizade demonstrados ao longo deste trabalho. Agradeço-lhe ainda a minuciosa e atenta revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Amadeu M. V. M. Soares, que me encaminhou para o "mundo da *Daphnia*", por ter aceite ser co-orientador desta tese. As suas qualidades humanas e científicas associadas ao seu bom humor e à sua disponibilidade constituíram sempre um precioso apoio e incentivo.

Aos Professores Doutores Jorge Eiras, Aires Oliva Teles e António Gouveia, enquanto exerceram as funções de Presidente do Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências do Porto, pela disponibilidade na utilização de equipamento e instalações do Departamento e da Estação de Zoologia Marítima Dr. Augusto Nobre.

À Professora Doutora Lúcia Guilhermino, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, pela possibilidade de realização da parte experimental que envolveu a acetilcolinesterase, pelos seus ensinamentos científicos e sugestões. O seu apoio e muito especialmente a sua amizade foram muito importantes.

Ao Professor Doutor Vitor Vasconcelos, responsável pelo meu interesse pelas cianobactérias, por ter cedido as estirpes de *Microcystis* e *Anabaena* e parte da bibliografia. Agradeço-lhe ainda pelas suas sugestões e leitura da tese, assim como pela amizade demonstrada.

Ao meu colega Filipe Oliva Teles, com quem partilhei o laboratório, pelo auxílio nos trabalhos pesados, sugestões, boa disposição e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências do Porto, o apoio prestado no trabalho de campo e no laboratório. Ao Sr. Pedro Correia, um agradecimento especial pelo apoio prestado com as culturas de cianobactérias e de *Daphnia*.

À minha família, por todo o apoio demonstrado.

Ao Toná e à Inês, pela preciosa ajuda na tradução do "résumé", assim como pela disponibilidade e amizade demonstradas.

Aos meus filhos, por terem prescindido em muitas ocasiões, do tempo da atenção e das histórias a que tinham direito. Ao Zé pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas e por ter suportado com paciência as minhas fases mais críticas.

Este trabalho foi apoiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Programa Ciência e PRAXIS XXI, através da concessão de uma Bolsa de Boutoramento BD/2787/93.

RESUMO

As cianobactérias interferem negativamente com as comunidades de cladóceros, devido ao seu inadequado valor nutricional, à interferência com a alimentação e à sua toxicidade. Nas cadeias tróficas dos ecossistemas de água doce, os cladóceros são um elo importante entre os produtores e os consumidores secundários, o que os torna organismos privilegiados no estudo da toxicidade das cianobactérias.

Foi objectivo deste trabalho avaliar os efeitos da toxicidade de *Microcystis aeruginosa* em várias fases do ciclo biológico (ovo, fase juvenil e fase adulta) de *Daphnia*. Pretendeu-se comparar a sensibilidade de três espécies que diferiam no contacto anterior com cianobactérias. Os indivíduos de *Daphnia pulex* foram isolados da lagoa de Mira, durante uma florescência de *Microcystis*; os de *Daphnia pulicaria* foram obtidos na lagoa do Viriato, onde não há registos de cianobactérias e os de *Daphnia magna* pertenciam a um clone mantido há muitos anos em cultura laboratorial. A sensibilidade das espécies foi ainda comparada relativamente aos efeitos induzidos pela anatoxina-a(s) na actividade da acetilcolinesterase.

Em condições laboratoriais controladas, indivíduos de *D. pulex*, *D. pulicaria* e de *D. magna*, obtidos por partenogénese a partir de uma fêmea, foram expostos a extractos aquosos ou células intactas da cianobactéria *M. aeruginosa*, durante períodos específicos do seu ciclo biológico. Foram avaliados os efeitos da toxicidade na sobrevivência e na reprodução.

A exposição a um extracto aquoso de *Microcystis* durante um período de 48 horas, reduziu a sobrevivência dos ovos, juvenis e indivíduos adultos de *Daphnia*, confirmando a sua toxicidade. Os ovos foram o estádio mais sensível e o seu desenvolvimento foi interrompido por contacto directo com o extracto. Os indivíduos adultos foram os mais resistentes. *D. magna* foi a espécie mais resistente e *D. pulicaria* a mais sensível. As diferenças interespecíficas registadas foram mais acentuadas para os juvenis e adultos do que para os ovos.

Indivíduos adultos de *Daphnia* foram expostos ao extracto de *Microcystis* durante o período compreendido entre o aparecimento da primeira postura na câmara de incubação e a libertação dos juvenis. As fêmeas foram depois colocadas em meio de cultura sem agente tóxico e mantidas até à libertação dos juvenis da quarta postura. O extracto provocou a interrupção do desenvolvimento dos ovos que se encontravam no ovário e na câmara de incubação. Na primeira postura, o extracto provocou a imediata interrupção no

desenvolvimento dos ovos. Nas posturas seguintes, para além do aumento do número de descendentes viáveis, o desenvolvimento embrionário processou-se até um estádio mais adiantado. As alterações quantitativas e qualitativas ocorridas nas posturas, estão aparentemente relacionadas, com a fase de desenvolvimento em que se encontravam os ovos durante o período de contacto das fêmeas com o tóxico.

A exposição ao extracto de *Microcystis* durante períodos de 24 horas, de indivíduos juvenis de diferentes idades, provocou uma redução na sobrevivência e reprodução na primeira postura. Os juvenis mais novos apresentaram efeitos negativos mais acentuados na sobrevivência, no crescimento e na duração da fase juvenil do que os registados nos juvenis mais velhos, que sofreram alterações sobretudo ao nível da reprodução, verificando-se redução do número total de juvenis e no número de juvenis viáveis da primeira postura.

Células intactas de duas estirpes de *Microcystis* fornecidas durante 21 dias a indivíduos de *Daphnia*, provocaram alterações na sobrevivência e na reprodução. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças de toxicidade entre as duas estirpes de *Microcystis*. As duas estirpes atrasaram o início da reprodução, reduziram o número de posturas e alteraram a viabilidade dos juvenis libertados. A sobrevivência e o tamanho das posturas foram apenas reduzidos pela estirpe hepatotóxica. A estirpe IZANCYA 4, que não se tem mostrado tóxica para mamíferos, induziu efeitos tóxicos nos cladóceros. Comparando os valores de toxicidade registados para as células com os obtidos para os extractos aquosos, verificou-se que as células foram muito mais tóxicas do que os extractos.

De um modo geral, a estirpe IZANCYA 2 de *M. aeruginosa* foi tóxica para todos os estádios de vida considerados, tendo sido evidenciadas diferenças de sensibilidade, que estão provavelmente associadas à interferência dos compostos tóxicos produzidos, nesta estirpe, com diferentes processos fisiológicos. Em todos os ensaios realizados foram detectadas diferenças de sensibilidade interespecíficas. Nos testes que utilizaram extracto aquoso de *M. aeruginosa*, e para a sobrevivência e reprodução, *D. pulicaria* foi a espécie mais sensível e *D. magna* a mais resistente. No teste com células intactas, e para a sobrevivência, *D. magna* manteve-se como a espécie mais resistente. No entanto, neste teste, foi a espécie mais sensível para os efeitos na reprodução. A sensibilidade das espécies de cladóceros às cianobactérias está dependente do modo como foi feito o contacto com o tóxico, podendo obter-se resultados diferentes consoante o parâmetro utilizado para a sua avaliação.

O ensaio de inibição *in vitro* da actividade da acetilcolinesterase (AChE) foi efectuado com indivíduos adultos, na presença de um extracto de *Anabaena* e de outro de *Microcystis*. O extracto de *Anabaena* reduziu significativamente a actividade da AChE, das três espécies,

enquanto para o extracto de *Microcystis* não se verificaram diferenças significativas na actividade desta enzima. A sensibilidade das espécies foi idêntica à registada nos testes com o extracto aquoso; *D. pulicaria* foi a espécie mais sensível e *D. magna* a mais resistente. O ensaio de inibição da actividade da AChE de *Daphnia*, parece poder constituir uma boa alternativa aos métodos actualmente utilizados para detectar a presença da anatoxina-a(s). No entanto, deve ser usado com precaução, dada a possibilidade da presença no meio, de toxinas de cianobactérias ou de outros agentes químicos que interfiram com a actividade desta enzima.

ABSTRACT

Cyanobacteria due to their inadequate nutritional value, physical interference during feeding and toxicity have a negative impact on cladoceran communities. Cladocerans are an important link between producers and consumers in freshwater ecosystems hence important organisms for the study of toxicity of cyanobacteria.

The objective of this work was the evaluation of the toxicity effects of *M. aeruginosa* in different phases of the life cycle (egg, juveniles and adults) of *Daphnia*. The sensitivity of three *Daphnia* species that differed on the previous contact with cyanobacteria was compared. *D. pulex* specimens were isolated from Mira lake during a bloom of *Microcystis*; *D. pulicaria* were isolated from Viriato lake, where cyanobacteria have never been registered; the clone of *D. magna* has being kept for many years in the laboratory. The sensitivity of these species was also compared studying the inhibition of acetylcholinesterase by anatoxin-a(s).

In controlled laboratory conditions, *D. pulex*, *D. pulicaria* and *D. magna* specimens obtained from partenogenetic reproduction from a single female were exposed to aqueous extracts or intact cells of the cyanobacterium *M. aeruginosa*, during specific periods of their biological cycle. The toxicity effects on the survivorship and reproduction were studied.

The exposure to an aqueous extract of *Microcystis* during 48 hours reduced the survivorship of the eggs, juveniles and adults confirming its toxicity. Eggs were the most sensitive phase and their development stopped after the contact with the extract. Adult was the most resistant stage. *D. magna* was the most resistant species and *D. pulicaria* the most sensitive. Interspecific differences were more significant for adults and juveniles than for the eggs.

Daphnia were also exposed to extracts of *Microcystis* during the period between the first transfer of the eggs to the brood chamber and the release of juveniles. These females were then transferred to culture media without toxins and kept until the release of the fourth brood. The extract caused the interruption of the development of the eggs that were in the ovary and in the brood chamber. The first transfer of the eggs to the brood chamber was affected by the extract and the development of the eggs was stopped. The subsequent broods were affected in a different way. There was an increase on the number of viable juveniles and the embryological development proceeded to more advanced stages. Qualitative and quantitative changes occurred during the release of juveniles, and this may be related to the developmental stage of the eggs at the time when the females contacted with the toxic extract.

The exposure of *Daphnia* juveniles of different ages to the *Microcystis* extract during 24 h periods caused a reduction of the survivorship and of the reproduction efficiency in the first brood. Younger juveniles showed more pronounced negative effects in the survivorship, growth and on the juvenile phase length than older juveniles. The latter presented negative effects mainly in the reproduction with decrease on the total number of juveniles and of viable juveniles.

Intact cells of two strains of *Microcystis* used as food for *Daphnia* during 21 days caused changes in the survivorship and reproduction. These results highlighted differences on the toxicity of the two *Microcystis* strains. Both strains delayed the beginning of reproduction, reduced the number of broods and changed the viability of the released juveniles. Survivorship and brood size were only reduced with the hepatotoxic strain. IZANCYA 4, a non toxic strain to mammals, was toxic to cladocerans. Intact cells were more toxic than extracts when comparing toxicity data.

The strain of *M. aeruginosa* was generally toxic to all life stages studied, and sensitivity differences may be pointed out, probably associated to the interference of toxic compounds of the cyanobacteria with different physiological processes. Interspecific sensitivity differences were detected in all the assays. Tests using the aqueous extract of *M. aeruginosa* showed that *D. pulicaria* was the most sensitive species regarding survivorship and reproduction and *D. magna* the most resistant. Tests with intact cells showed that *D. magna* was also the most resistant species considering survivorship. Nevertheless, *D. magna* was the most affected in terms of reproduction. The sensitivity of cladocerans to toxic substances depends on the exposure type.

The *in vitro* inhibition assay of the acetylcholinesterase activity (AChE) was done with adults using extracts of *Anabaena* and *Microcystis*. *Anabaena* extract reduced significantly the AChE activity of the three cladoceran species while the *Microcystis* extract did not affect it. The sensitivity was similar to that obtained with the aqueous extract; *D. pulicaria* was the most sensitive and *D. magna* the most resistant. This inhibition assay may be used to detect anatoxin-a(s), although cyanobacteria toxins or other chemical agents may interfere with the enzyme activity.

RÉSUMÉ

Les cyanobactéries interfèrent négativement, sur les communautés de cladocères, a cause de son inadéquat valeur nutricionel, de l'interference avec l'alimentation et à ça toxicité. Dans les chaînes trophiques des écosystemes de l'eau douce, les cladocères sont une liaison importante entre les producteurs et les consomateurs ce qui rend ces organismes previlégiés pour l'étude de la toxicité des cyanobactéries.

Le but de ce travail, fut d'apprecier les effects de la toxicité de *M. aeruginosa* en plusieurs phases du cicle biologique (oeuf, phase de juvénil et phase adulte) de *Daphnia*. On voulait aussi comparer la sensibilité de trois espèces qui se comportent différemment lors de l'exposition aux cyanobactéries. Les individus de *D. pulex* ont été isolés de la Lagoa de Mira pendant une fleur d'eau de *Microcystis*, ceux de *D. pulicaria* ont été obtenu dans Lagoa de Viriato, oú il n'y a pas de cyanobactéries, et ceux de *D. magna* appartenait a un clone maintenu, il y a beaucoup d'années, en culture laboratoriale. La sensibilité des espèces a aussi été comparé par rapport aux effets produits dans l'activité de acetilcolinesterase par l'anatoxine-a(s)

En conditions laboratoriales controlées, individus de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*, obtenus par parthénogénèse a partir d'une femmele, ont été exposés à des extraits aqueux ou à des cellules vivantes de la cyanobactérie *M. aeruginosa*, pendant des périodes specifiques de son cycle byologique. Les effects de la toxicité sur la survie et la reproduction ont été apréciés.

L'exposition à un extrait aqueux de *Microcystis* pendant une période de 48 heures a réduit la survie des oeufs, juvéniles et adultes, confirmant la toxicité. Les oeufs ont été plus sensibles et son développement a été interrompu par contact direct avec l'extrait. Les adultes ont été les plus resistants. *D. magna* a été l'espèce plus résistante et *D. pulicaria* la plus sensible. Les différences interspécifiques enregistrées ont été plus accentuées pour les juvéniles et les adultes que pour les oeufs.

Les individus de *Daphnia* ont été exposés à l'extrait de *Microcystis* pendant la période entre la première pondaison dans la chambre d'incubation et la libération des juvéniles. Les femmeles ont été aprés mises en millieu de culture sans toxiques et maintenues jusqu'à la libération des juvéniles de la quatriéme pondaison. L'extrait a provoqué l'interruption du developement des oeufs qui se trouvaient dans l'ovaire et dans la chambre d'incubation. Dans la première pondaison l'extrait a provoqué l'interruption immediate du développement des oeufs. Dans les pondaisons suivantes, en plus de l'augmentation du numéro de descendants, le

développement embryonnaire s'est procédé jusqu'à un stade plus avancé. Les altérations quantitatives et qualitatives parvenues pendant les pondaisons sont apparemment relationnées avec la phase de développement où se trouvaient les oeufs pendant la période de contacte des femmeles avec le toxique.

L'exposition à l'extrait de *Microcystis* pendant des périodes de 24 heures, de juvéniles de differents ages, a provoqué la diminuition de survie et la réduction d'efficacité de la reproduction de la première pondaison. Les juvéniles plus jeunes ont présenté des effects négatives plus accentués pendant la survie, l'agrandissement et la durée de la phase de juvénile, que les enregistrés sur les juvéniles plus agés. Ceux-ci ont presenté des effects négatives notamment dans la reproduction, avec réduction de la quantité totale des juvéniles, et du numéro des juvéniles viables.

Des cellules vivantes de deux types de *Microcystis,* fournies pendant 21 jours à des individus de *Daphnia* ont provoqué des alterations de survie et de reprodution. Les résultats obtenus nous montrent des différences de toxicité entre les deux types de *Microcystis*. Les deux souches ont retardé le début de la reproduction, ont réduit le numéro de pondaisons et ont changé la viabilité des juvéniles liberés. La survie et la taille des pondaisons ont été seulement reduites par la souche hepatotoxique. La souche IZANCYA 4, non toxique pour les mammifères, a été toxique pour les cladocères. Les valeurs de toxicité enresgistrées pour les céllules ont été beaucoup plus toxiques que ceux obtenus pour les extraits aqueux.

D'une façon générale, le souche de *M. aeruginosa* a été toxique pour tous les stades de vie considéré. Les différences de sensibilité observées sont probablement associées a l'interference des composants toxiques présents dans ce souche avec des différents procés physiologiques. Des différences de sensibilité interspécifique ont été detectées dans tous les essais realisés. Dans les testes avec extraits aqueux de *M. aeruginosa* et pour la survie et reproduction, *D. pulicaria* a été l'éspèce la plus sensible et *D. magna* la plus résistante. Dans le test avec ces cellules vivantes, et pour la survie, *D. magna* a été toujours la plus résistante. Cependant, celle ci a été l'espèce la plus sensible en ce qui concerne les effects sur la reproduction. La sensibilité des espèces de cladocères aux cyanobacteries dépend de la façon comment le contact a été fait avec les toxiques, pouvant entraîner des resultats différents suivant le paramètre utilisé pour son appreciation.

L'essai d'inhibition *in vitro* de l'activité de l'acetilcolinesterase (AChE) a été fait avec des individus adultes, en presence d'un extrait de *Anabaena* et d'un de *Microcystis*. L'extrait de *Anabaena* a réduit significativement l'activité de AChE pour les trois espèces, tandis que pour l'extrait de *Microcystis* aucune différence significative de l'enzyme a été observé. La

sensibilité des espèces a été identique a celle enregistrée avec les tests en extrait aqueux; *D. pulicaria* a été l'espèce la plus sensible et *D. magna* la plus resistante. L'essai d'inhibition d'activité du AChE de *Daphnia*, semble être une bonne alternative pour la detection de l'anatoxine-a(s). Cependant, il doit être utilisé avec precaution, étant donné la possibilité de la présence dans le millieu de toxines de cyanobacteries, ou d'autres agents chimiques que puissent intervenir avec l'activité de l'enzyme.

ÍNDICE

RESUMO v
ABSTRACT viii
RÉSUMÉ x

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Introdução geral 2
1.1.1. Cianobactérias 2
1.1.2. Cianotoxinas 3
1.1.2.1. Péptidos cíclicos 3
1.1.2.2. Alcalóides 7
1.1.2.3. Lipopolissacarídeos 8
1.1.2.4. Outros compostos bioactivos 9
1.1.3. Efeitos das cianobactérias nos cladóceros 9
1.2. Objectivos 11

2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* NO CICLO DE VIDA DE *Daphnia magna, Daphnia pulex* e *Daphnia pulicaria* 13
2.1. Padronização das condições de cultura e experimentais 14
2.1.1. Introdução 14
2.1.2. Locais de origem das espécies de *Daphnia* estudadas 16
2.1.3. Cultura de *Daphnia* 17
2.1.3.1. Isolamento 17
2.1.3.2. Estrutura do sistema de cultura 18
2.1.3.3. Meio de cultura 19
2.1.3.4. Alimentação 19
2.1.4. Cultura de *M. aeruginosa* 23
2.1.4.1. Características gerais 23
2.1.4.2. Condições de cultura 24
2.1.4.3. Preparação do extracto de *M. aeruginosa* 24
2.1.4.4. Quantificação de microcistinas 25
2.2. Toxicidade aguda de *M. aeruginosa* em ovos, juvenis e adultos de *Daphnia* 26
2.2.1. Introdução 26

2.2.2. Objectivos 28
2.2.3. Material e métodos 28
2.2.3.1. Testes com ovos 28
2.2.3.2. Testes com juvenis 29
2.2.3.3. Testes com indivíduos adultos 29
2.2.3.4. Análise estatística 30
2.2.4. Resultados 30
2.2.5. Discussão 33
2.3. Toxicidade de *M. aeruginosa* durante a oogénese e desenvolvimento embrionário de *Daphnia* 41
2.3.1. Introdução 41
2.3.2. Objectivos 43
2.3.3. Material e Métodos 43
2.3.3.1. Condições gerais 43
2.3.3.2. Análise estatística 46
2.3.4. Resultados 46
2.3.4.1. Oxigénio, pH e concentração de microcistinas 46
2.3.4.2. Inibição da reprodução no final do teste 46
2.3.4.3. Inibição da reprodução em cada postura 49
2.3.4.4. Avaliação qualitativa do tipo de descendentes inviáveis 56
2.3.5. Discussão 59
2.3.5.1. Concentração de oxigénio e pH 59
2.3.5.2. Sobrevivência 59
2.3.5.3. Reprodução 60
2.3.5.4. Efeitos na primeira postura 61
2.3.5.5. Efeitos na segunda postura 63
2.3.5.6. Efeitos na terceira e quarta posturas 64
2.3.5.7. Diferenças entre as posturas 65
2.3.5.8. Diferenças interespecíficas 66
2.4. Toxicidade de *M. aeruginosa* durante o período juvenil de *Daphnia* 68
2.4.1. Introdução 68
2.4.2. Objectivo 70
2.4.3. Material e métodos 70
2.4.3.1. Procedimentos gerais 70

2.4.3.2. Determinação do comprimento do corpo dos cladóceros 71
2.4.3.3. Análise estatística 72
2.4.4. Resultados 73
2.4.4.1. Oxigénio, pH e concentração de microcistinas 73
2.4.4.2. Sobrevivência 73
2.4.4.3. Reprodução 74
2.4.5. Discussão 79
2.5. Toxicidade das células intactas de *M. aeruginosa* em *Daphnia* 84
2.5.1. Introdução 84
2.5.2. Objectivos 85
2.5.3. Material e métodos 86
2.5.3.1. Preparação das células de *M. aeruginosa* 86
2.5.3.2. Procedimentos gerais 86
2.5.3.3. Análise estatística 87
2.5.4. Resultados 88
2.5.4.1. Oxigénio, pH e concentração de microcistinas 88
2.5.4.2. Sobrevivência 88
2.5.4.3. Reprodução 90
2.5.5. Discussão 95

3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE 100
3.1. Efeito de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia* 101
3.1.1. Introdução 101
3.1.2. Objectivos 102
3.1.3. Material e métodos 102
3.1.4. Resultados 104
3.1.5. Discussão 108
4. CONCLUSÕES 111
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução geral

1.1.1. Cianobactérias

O desenvolvimento de elevadas densidades de algas ou de cianobactérias no meio aquático, também denominado "bloom" ou florescência, é um fenómeno natural, cujo impacto na saúde pública e economia tem vindo a aumentar, nas últimas décadas, em termos de frequência, intensidade e distribuição geográfica (Hallegraeff, 1993; Smayda, 1997; Carmichael, 1997). O aparecimento de um número cada vez maior de problemas associados a algas tóxicas tem levado a um crescente interesse da comunidade científica por este assunto, o que tem provocado não só um aumento do número de casos detectados mas também o alargamento da sua distribuição geográfica. A eutrofização das águas, decorrente de descargas industriais, domésticas e urbanas, a intensificação da exploração dos recursos aquáticos e as alterações climáticas dos últimos tempos têm, também, contribuído para a estimulação deste fenómeno.

As florescências de algas ou de cianobactérias têm geralmente um impacto negativo nas comunidades aquáticas. Devido ao seu baixo valor nutricional ou a problemas mecânicos relacionados com o tamanho, constituição ou forma das células, podem provocar situações de jejum nas comunidades herbívoras. Quando ocorre a sua decomposição podem, ainda, provocar anóxia e valores elevados de amónia no meio, que são, por vezes, letais, principalmente para as comunidades piscícolas. Alguns grupos de algas e de cianobactérias têm ainda a capacidade de produzir toxinas, que podem atingir as comunidades que vivam ou entrem em contacto com a água, incluindo o Homem.

Em água salgada, o principal grupo de organismos responsável pela produção de toxinas são os Dinoflagelados, enquanto no meio dulciaquícola são as cianobactérias.

As cianobactérias, também denominadas algas azuis, são organismos procarióticos fotossintéticos, com características comuns às algas e às bactérias, formando um grupo com posição taxonómica controversa, composto por cerca de 2000 espécies, distribuídas por 150 géneros (Skulberg *et al.*, 1993). São capazes de produzir uma grande e diversificada quantidade de metabolitos secundários (isto é, que não são usados para o seu metabolismo primário), incluindo compostos que podem actuar como hormonas, antibióticos, aleloquímicos, toxinas e outros compostos cujas propriedades bioquímicas e funções são ainda desconhecidas (Carmichael, 1992; Chorus e Bartram, 1999). Das espécies conhecidas, cerca de 40 apresentam estirpes que têm a capacidade de produzir toxinas (Carmichael e Gorham, 1981; Skulberg *et al.*, 1984; 1993). Desde finais do século XIX que as cianobactérias são reconhecidas como potenciais agentes produtores de toxinas (Francis, 1878). Desde então, têm sido identificadas como causadoras de efeitos letais, não só em organismos aquáticos, como zooplâncton e peixes (Lampert, 1981a; Fulton e Paerl, 1987; Penãloza *et al.*, 1990; Oliveira, 1991; DeMott *et al.*, 1991; Kobayashi, 1992), mas também a aves (Eriksson *et al.*, 1986) e mamíferos (Runnegar e Falconer, 1982; Jackson *et al.*, 1984), incluindo o Homem (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999a).

1.1.2. Cianotoxinas

As toxinas produzidas pelas cianobactérias, denominadas cianotoxinas, podem ser incluídas em três grupos, com base na sua estrutura química: péptidos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (LPS) (Tabela 1.1.).

1.1.2.1. Péptidos cíclicos

No grupo dos péptidos cíclicos, incluem-se as hepatotoxinas, microcistinas (MCYST) e nodularinas, constituídas por sete e cinco aminoácidos, respectivamente, e que possuem estrutura química e mecanismos de toxicidade semelhantes (Carmichael, 1992, 1994, 1997). A cilindrospermopsina, embora quimicamente pertença ao grupo dos alcalóides é também uma hepatotoxina (Hawkins *et al.*, 1985).

Tabela 1.1. Tipos de toxinas, orgãos alvo nos Mamíferos e géneros produtores das cianotoxinas (adaptado de Sivonen e Jones, 1999).

Toxinas	Orgão alvo (Mamíferos)	Género de cianobactéria produtora
Péptidos cíclicos		
Microcistina	Fígado	*Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis*
Nodularina	Fígado	*Nodularia*
Alcalóides		
Anatoxina-a	Sinapses nervosas	*Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon*
Anatoxina-a(s)	Sinapses nervosas	*Anabaena*
Saxitoxina	Axónios	*Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis*
Cilindrospermopsina	Fígado	*Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia*
Aplisiatoxina	Pele	*Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix*
Lingbiatoxina-a	Pele, tracto gastrointestinal	*Lyngbya*
Lipopolissacarídeos		
	Todos os tecidos expostos	Todos os géneros referidos

Microcistinas

As microcistinas são péptidos cíclicos constituídos por sete aminoácidos, com os dois aminoácidos terminais ligados, solúveis em água e que apresentam uma grande estabilidade química (Kiviranta *et al.*, 1991a; Jones e Orr, 1994). A maioria das microcistinas é incapaz de atravessar directamente as membranas lipídicas das células animais, vegetais e bacterianas. No entanto, em florescências de *Microcystis* ocorridas no Canadá, foram isoladas as microcistinas MCYST-LL, LV e LM, que apresentam caracter hidrofóbico (Craig *et al.*, 1993).

As microcistinas foram inicialmente denominadas "fast-death factor" (Bishop *et al.*, 1959), microcistinas (Konst *et al.*, 1965), cianoginosinas (Botes *et al.*, 1984) e cianoviridinas (Kusumi *et al.*, 1987). A partir de 1988, foi adoptada a designação microcistina (MCYST) em virtude de estas toxinas terem sido isoladas pela primeira vez a partir da espécie *Microcystis aeruginosa* e foram adicionadas as letras XY como sufixo para designar as variantes dos L-aminoácidos que correspondem a variantes das microcistinas (Carmichael *et al.*, 1988).

Estrutura química das microcistinas

A estrutura geral destes heptapeptídeos é actualmente definida como: Ciclo-(D-alanina^1-X^2-D-MeAsp^3-Z^4-Adda^5-D-glutamato^6-Mdha^7) em que X^2 e Z^4 são variações nos L-aminoácidos, D-MeAsp^3 é D-eritro-β-ácido metilaspártico, Adda^5 é (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico e Mdha^7 é N-metildehidroalanina (Carmichael, *et al.*, 1988; Carmichael, 1992) (Figura 1.1). Já foram registadas cerca de 60 variantes das microcistinas, com variações estruturais que podem ocorrer nos sete aminoácidos sendo, no entanto, os L-aminoácidos nas posições 2 e 4 e a demetilação dos aminoácidos das posições 3 e/ou 7 as substituições mais frequentes (Sivonen e Jones, 1999). A MCYST-LR, em que os aminoácidos X e Y correspondem respectivamente, à leucina e à arginina, é a microcistina dominante em amostras de florescências e estirpes isoladas em Portugal (Vasconcelos, *et al.*, 1993; 1995; 1996).

Mecanismo de toxicidade

A toxicidade das amostras de cianobactérias recolhidas no meio natural, ou originadas a partir de estirpes cultivadas em laboratório, é normalmente avaliada através da sua administração a murganhos. As hepatotoxinas, assim chamadas por atingirem tipicamente o fígado, onde penetram nos hepatócitos através do sistema de transporte dos sais biliares, são inibidoras *in vitro* e *in vivo* das fosfatases proteicas de serina/treonina do tipo 1 (PP1) e 2A (PP2A) (Eriksson *et al.*, 1990; Honkanen *et al.*, 1990; Mackintosh *et al.*, 1990; Lin e Chu, 1994). Ao provocarem a hiperfosforilação dos componentes proteicos do citoesqueleto, nomeadamente microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos (Eriksson *et al.*, 1988; Wickstrom *et al.*, 1995; Carmichael, 1997), promovem alterações na morfologia das células que levam à desagregação do parênquima por separação dos hepatócitos (Carmichael, 1992; 1994). As células do endotélio dos capilares sinusóides também sofrem separação e o sangue sai para o parênquima hepático provocando intensa hemorragia, lesões nos tecidos e, posteriormente, choque hipovolémico, ocorrendo a morte em apenas algumas horas em intoxicações agudas (Theiss *et al.*, 1988; Carmichael, 1992; 1994).

A toxicidade destes compostos, resultante da inibição das fosfatases proteicas (Eriksson *et al.*, 1990; Honkanen *et al.*, 1990; Mackintosh *et al.*, 1990) está associada à estrutura da molécula na zona Adda-glutamato, que parece ser fundamental para a ligação com a molécula da fosfatase proteica (Goldberg *et al.*, 1995). As microcistinas estabelecem ainda uma ligação covalente entre a enzima e o aminoácido Mdha. A associar ainda esta parte

da molécula da microcistina à sua toxicidade refere-se que as poucas variantes não tóxicas das hepatotoxinas que já foram encontradas apresentam modificações estruturais nesta zona (Harada *et al.*, 1990; Rinehart *et al.*, 1994). Existem ainda microcistinas e nodularinas lineares, que são muito menos tóxicas que as suas correspondentes cíclicas, e que se julga serem percursores das toxinas e/ou produtos resultantes da sua degradação por acção de enzimas bacterianas (Rinehart *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996). A bactéria do género *Sphingomonas* é portadora de uma enzima, denominada microcistinase, que é capaz de hidrolisar a ligação peptídica entre o aminoácido Adda e a arginina da forma cíclica da MCYST-LR, originando um péptido linear com reduzida capacidade de interacção com as fosfatases proteicas e que, por esse motivo, apresenta uma menor toxicidade (Bourne *et al.*, 1996).

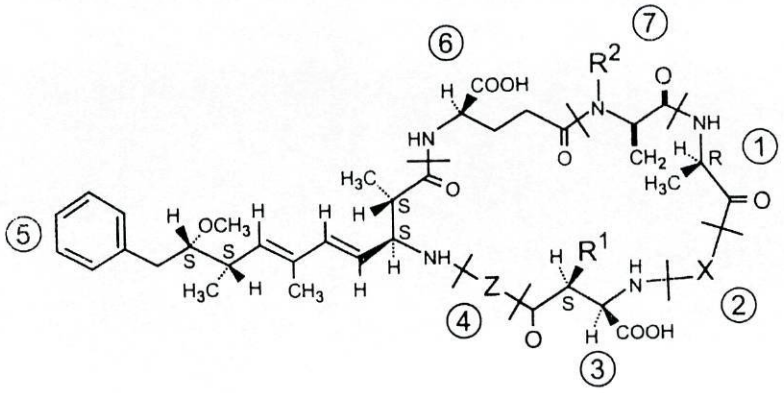
Localização e síntese das toxinas nas células

As microcistinas são as cianotoxinas mais estudadas. No entanto, os mecanismos responsáveis pela sua síntese e função são ainda desconhecidos. Em cultura, as microcistinas são produzidas continuamente e apresentam uma concentração máxima por célula na fase de transição entre o final da fase exponencial e a fase estacionária de crescimento (Arment e Carmichael, 1996). Nas culturas de cianobactérias, o aumento em microcistinas que ocorre a partir do fim da fase exponencial de crescimento é principalmente devido à acumulação de microcistinas no interior das células e não a um aumento da sua síntese (Arment e Carmichael, 1996).

Atendendo à sua natureza cíclica, reduzidas dimensões, à presença de D-aminoácidos na sua estrutura e à produção de várias toxinas homólogas numa mesma cultura, tem vindo a ser sugerido que as microcistinas são produzidas por um mecanismo enzimático não ribossomal, que é o responsável pela produção de metabolitos secundários de natureza peptídica em bactérias e fungos (Arment e Carmichael, 1996).

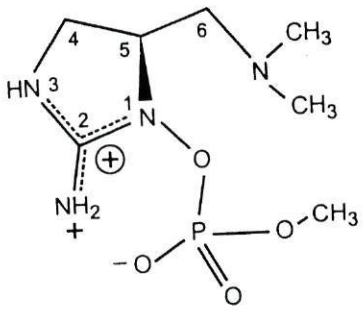
As microcistinas são endotoxinas, o que pressupõe que a sua libertação para o meio só ocorre após lise celular. No entanto, foram já detectadas microcistinas, em pequena quantidade, na parede celular e na baínha envolvente de *M. aeruginosa* (estirpe PCC7820), o que sugere que a sua libertação para o exterior pode ocorrer também em células intactas (Shi *et al.*, 1994). A libertação da maior parte das microcistinas produzidas ocorre por lise celular, o que sugere o seu armazenamento na célula. No entanto, a sua presença não foi detectada em inclusões celulares de vários tipos que funcionam como locais de armazenamento na célula (Shi *et al.*, 1994). As microcistinas têm vindo a ser localizadas principalmente na área dos

tilacóides e do nucleóide, o que sugere a sua relação com a actividade fotossintética (Shi *et al.*, 1994).



Microcistina

Ciclo-(D-alanina[1]-X[2]-D-MeAsp[3]-Z[4]-Adda[5]-D-glutamato[6]-Mdha[7])



Anatoxina-a(s)

$C_7H_{17}N_4O_4P$

Figura 1.1. Estrutura química das microcistinas e da anatoxina-a(s). Adaptado de Sivonen e Jones (1999).

1.1.2.2. Alcalóides

No grupo dos alcalóides incluem-se compostos azotados heterocíclicos (com pelo menos uma estrutura em anel) que englobam vários tipos de toxinas, que consoante o seu modo de actuação podem ser distribuídas por três grupos: alcalóides neurotóxicos, citotóxicos e dermatotóxicos.

Os alcalóides neurotóxicos actuam ao nível das sinapses colinérgicas e interferem com o processo de condução e propagação do estímulo nervoso. A anatoxina-a, imita o efeito da acetilcolina e liga-se ao seu receptor na membrana pós-sináptica, induzindo por exemplo, a contracção contínua das células musculares, levando à fadiga e paralisia muscular (Carmichael, 1994). A anatoxina-a(s), embora provoque o mesmo efeito, actua por inibição da acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, interferindo com a transmissão do impulso nervoso (Mahmood e Carmichael, 1987; Hyde e Carmichael, 1991; Carmichael, 1994). A saxitoxina é uma toxina que provoca a interrupção da passagem do impulso ao longo da membrana da célula nervosa por bloqueio dos canais de sódio, impedindo a posterior estimulação das células musculares (Carmichael, 1994).

No grupo dos alcalóides citotóxicos encontra-se a cilindrospermopsina, detectada inicialmente em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins *et al.*, 1985) que na sua forma pura afecta principalmente o fígado, provocando também necrose nas células do rim, das glândulas adrenais, pulmões, coração, medula e timo (Hawkins *et al.*, 1985; 1997). Estudos realizados *in vitro* mostraram que também inibe a síntese de glutationa e a síntese proteica em geral (Runnegar *et al.*, 1994; 1995; Terao *et al.*, 1994).

No grupo dos alcalóides dermatotóxicos estão incluídas as toxinas aplisiatoxina e lingbiatoxina, produzidas por cianobactérias bênticas de água salgada dos géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix*, que causam inflamações cutâneas por contacto dos filamentos com a pele e que são fortes promotoras de tumores (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999a,b).

1.1.2.3. Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos (LPS) são geralmente encontrados na membrana externa da parede celular das bactérias Gram negativas, incluindo cianobactérias, onde formam complexos com as proteínas e fosfolípidos e são normalmente pirogénicos e tóxicos (Weckesser e Drews, 1979). Têm uma estrutura geral comum, composta por três regiões estruturais. A parte interna é constituída por um lípido denominado lípido A, que está ligado à membrana celular e que representa a região endotóxica do heteropolímero. A região média é constituída por um oligossacarídeo que liga o lípido A a um polissacarídeo externo (Scholtissk *et al.*, 1991). Os LPS das cianobactérias são menos tóxicos do que os LPS de *Salmonella* e do que as neuro e hepatotoxinas (Raziuddin *et al.*, 1983) estando associados a casos de irritações cutâneas, gastrointestinais e alergias das vias respiratórias (Ressom *et al.*, 1994).

1.1.2.4. Outros compostos bioactivos

Para além das cianotoxinas já referidas, as cianobactérias produzem compostos com constituição química muito diversa, alguns dos quais apresentam propriedades antibióticas antivíricas, antifúngicas, antibacterianas, antialgais, farmacológicas, ou outras tendo potencialmente interesse para aplicação em medicina, agricultura e investigação científica (Carmichael, 1992; Patterson *et al.*, 1994; Borowitzka, 1995; Namikoshi e Rinehart, 1996; Carmichael, 1997).

As cianobactérias são também responsáveis pela produção de compostos cuja actividade e composição química é ainda total ou parcialmente desconhecida (Namikoshi e Rinehart, 1996; Chorus e Bartram, 1999), incluindo substâncias químicas que podem ser tóxicas para as comunidades existentes no meio aquático onde se desenvolvem as florescências. A fracção de ácidos gordos de uma estirpe não tóxica de *M. aeruginosa* e outra de *Aphanizomenon flos-aquae* inibiu o crescimento da alga *Chlorella* (Ikawa *et al.*, 1994; Ikawa *et al.*, 1996). Campbell *et al.* (1994), ao realizarem um ensaio com Microtox e várias fracções de extractos de *Microcystis* e *Anabaena*, verificaram que ocorria inibição por compostos diferentes das microcistinas. Extractos de *Anabaena circinalis*, *Gomphosphaeria sp.* e *Aphanizomenon flos-aquae* que não eram hepatotóxicos nem neurotóxicos revelaram toxicidade para *Artemia* (Kiviranta *et al.*, 1991b). Uma estirpe de *Oscillatoria agardhii*, não tóxica para murganhos revelou-se tóxica para os crustáceos *Daphnia pulex* e *Artemia salina*, tendo sido detectada uma toxina com peso molecular de 2000 (Reinikainen *et al.*, 1995b). Na estirpe PCC7806 de *M. aeruginosa* foi detectado um composto desconhecido, diferente das microcistinas, que é tóxico para *Daphnia* (Jungmann *et al.*, 1991; Jungmann, 1992; Jungmann e Benndorf, 1994; Jungmann, 1995).

1.1.3. Efeitos de cianobactérias em cladóceros

Os trabalhos que estudam as interacções entre as cianobactérias e o zooplâncton no meio natural ou em laboratório, têm mostrado que as cianobactérias de uma maneira geral interferem negativamente com o zooplâncton, devido não só à possibilidade de produzirem compostos tóxicos mas também por não constituirem um alimento de boa qualidade (Haney, 1987; De Bernardi e Giussani, 1990; Hanazato, 1995). O seu valor nutricional, digestibilidade, morfologia e a possibilidade da presença de compostos tóxicos determinam a

qualidade das cianobactérias como alimento para os cladóceros.

A composição bioquímica das cianobactérias, determina o seu valor nutricional podendo ser ou não adequada às necessidades nutricionais das diferentes espécies de zooplâncton. *D. pulex* alimentada com *Aphanizomenon* apresenta um baixo índice lipídico e não atinge a maturidade (Holm e Shapiro, 1984). As células e colónias de *Anabaena* são de baixo valor nutricional para *Daphnia* (Porter e Orcutt, 1980). Embora as cianobactérias não apresentem todos os elementos essenciais para o crescimento do zooplâncton, detritos originados a partir de filamentos de *Oscillatoria limnetica* podem constituir uma fonte de proteínas, lípidos e carbohidratos para *Daphnia galeata*, permitindo o seu crescimento e reprodução (Repka *et al.*, 1998). A presença de elevadas densidades de *M. aeruginosa* no lago Valencia (Venezuela) não altera a densidade populacional de cladóceros (Infante e Riehl, 1984). No mesmo ecossistema, elevadas densidades de copépodes e de rotíferos foram também registadas na presença de elevadas densidades de *Lyngbya* e *Oscillatoria* (Infante e Riehl, 1984). *Moina macrocopa* reproduz-se quando alimentada com *Microcystis* (Hanazato e Yasuno, 1984) enquanto *Moina micrura* apresenta crescimento e reprodução reduzidos (Hanazato e Yasuno, 1987).

As cianobactérias possuem muito frequentemente camadas gelatinosas que protegem e impedem a digestão eficiente das células e das colónias ao longo do tubo digestivo (Porter, 1973; Kobayashi, 1992). A taxa de assimilação de *Daphnia* alimentada com cianobactérias é normalmente muito baixa (Arnold, 1971; Lampert, 1977; De Bernardi e Giussani, 1990).

No meio natural, quando a comunidade fitoplanctónica deixa de ser dominada por algas Clorofíceas e Diatomáceas e passa a ser principalmente constituída por cianobactérias ocorre, nas comunidades de cladóceros, a substituição das espécies de maior tamanho por outras de menores dimensões (De Bernardi e Giussani, 1990). Esta alteração na estrutura da comunidade zooplanctónica tem sido parcialmente atribuída à diferente interferência que as cianobactérias têm no modo de alimentação dos cladóceros de dimensões distintas (Arnold, 1971; Gliwicz, 1969; 1977; Porter e Mc Donough, 1984; De Bernardi e Giussani, 1990). A selecção, filtração e ingestão de alimento nos cladóceros são influenciadas negativamente pelas formas coloniais e filamentosas das cianobactérias, sendo este efeito mais acentuado nas espécies de cladóceros de maiores dimensões.

Para além do deficiente valor nutricional, das dificuldades de assimilação e dos problemas mecânicos na alimentação que as cianobactérias podem provocar em *Daphnia*, algumas espécies e estirpes de cianobactérias têm a capacidade de produzir compostos químicos que são tóxicos para estes organismos. As cianobactérias produzem um elevado número de

toxinas que têm um efeito negativo altamente variável entre géneros, espécies e até clones de zooplâncton. Assim, estirpes tóxicas de *Anabaena flos-aquae* e *Lyngbya sp.* reduzem de forma diferencial a reprodução de clones do rotífero *Asplanchna girodi* (Snell, 1980). Gilbert (1990), ao avaliar os efeitos de *Anabaena affinis* em *Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia ambigua*, *D. galeata mendotae*, *D. magna* e em dois clones de *D. pulex*, encontrou diferenças de susceptibilidade associadas à reprodução, entre os organismos dos diferentes géneros, espécies e clones. Em ensaios agudos com toxinas puras de *M. aeruginosa* e de *Nodularia spumigena* foram encontradas diferenças na sobrevivência de *Diaptomus birgei*, *D. pulicaria*, *D. hyalina* e *D. pulex*, que foram atribuídas a diferenças de sensibilidade fisiológica entre as espécies e a diferente comportamento na alimentação (DeMott *et al.*, 1991). Nestas espécies, ocorre também diferente grau de inibição das fosfatases proteicas 1 e 2A pela microcistina-LR (DeMott e Dhawale, 1995). Em exposições agudas e crónicas a células de uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa*, foram encontradas diferenças na sobrevivência e reprodução de clones de *D. pulex* (Hietala *et al.*, 1996; 1997).

As espécies de zooplâncton apresentam, portanto, diferentes susceptibilidades, que são o resultado da interacção entre as características químicas e morfológicas das cianobactérias e a morfologia e sensibilidade fisiológica dos organismos.

As cianobactérias ao afectarem negativamente os cladóceros interferem com as comunidades de fitoplâncton e de predadores, perturbando toda a cadeia trófica e o equilíbrio do ecossistema. O estudo das interacções das cianobactérias com os cladóceros no meio natural origina frequentemente resultados muito complexos e de difícil interpretação, uma vez que existem inúmeros factores que, de forma independente ou não, podem influenciar esta relação. Refere-se, a título de exemplo, a influência das características físico-químicas do meio na toxicidade e na sensibilidade das espécies, a exposição simultânea a toxinas dissolvidas e a células intactas, que adicionam os efeitos do baixo valor nutricional ao dos compostos tóxicos, e a exposição simultânea de organismos de diferentes espécies, genótipos e idades que apresentam normalmente diferentes sensibilidades e que podem interagir. Os clones e as espécies de zooplâncton apresentam diferenças de susceptibilidade às cianobactérias tóxicas, que levam a supor que estas constituem, no meio natural, uma pressão selectiva que favorece as estirpes e as espécies mais resistentes (Snell, 1980; DeMott *et al.*, 1991; Barros, 1994; Hietala *et al.*, 1997)

1.2. Objectivos

Foram estudadas neste trabalho, três espécies de *Daphnia* originárias de ambientes com diferentes pressões de cianobactérias. O clone de *D. pulicaria* foi obtido na lagoa do Viriato, na Serra da Estrela, onde não foram detectadas cianobactérias (Boavida e Gliwicz, 1994; Barros *et al.*, 2000). O clone de *D. pulex* foi obtido na lagoa de Mira durante uma florescência de *M. aeruginosa*. A outra espécie estudada foi *D. magna* considerada como um dos organismos padrão para a realização de ensaios de toxicidade.

Uma vez que os organismos de diferentes idades apresentam diferentes sensibilidades aos compostos tóxicos, foi objectivo deste trabalho estudar os efeitos da cianobactéria *M. aeruginosa* em algumas fases (ovo, fase juvenil e fase adulta) do ciclo biológico das espécies de *Daphnia*, em condições laboratoriais controladas.

Foi também objectivo deste trabalho, avaliar se os indivíduos de *D. pulex*, originários de um lago onde se desenvolvem grandes densidades de cianobactérias, apresentam menor sensibilidade às toxinas do que os indivíduos de *D. pulicaria* oriundos de um lago onde as cianobactérias estão ausentes. A sensibilidade destas espécies foi ainda comparada com a de *D. magna* que devido a estar em cultura há muitos anos, está bem adaptada às condições laboratoriais que foram usadas nos testes.

A actividade da AChE é utilizada como biomarcador para a detecção da presença de insecticidas organofosforados e carbamatos, cujo mecanismo de toxicidade é idêntico ao da neurotoxina anatoxina-a(s) (Carmichael, 1994). As espécies de *Daphnia* estudadas neste trabalho nunca devem ter contactado com a anatoxina-a(s), dado que esta tem, até ao momento, uma distribuição geográfica muito localizada e nunca foi detectada na lagoa de Mira nem na do Viriato. Utilizando o ensaio de inibição da AChE, compararam-se as sensibilidades das espécies de *Daphnia* e avaliou-se a viabilidade do ensaio como método de rastreio da presença de anatoxina-a(s) no meio natural.

2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Microcystis aeruginosa* NO CICLO DE VIDA DE *Daphnia pulex*, *Daphnia pulicaria* E *Daphnia magna*

2.1. Padronização das condições de cultura e experimentais

2.1.1. Introdução

Em Ecotoxicologia, a variabilidade de resultados obtida nos testes realizados com organismos da mesma espécie, pode ter origem genética ou ambiental (Soares e Calow, 1993). De modo geral, existem diferenças de sensibilidade entre indivíduos com diferentes constituições genéticas (Baird *et al.*, 1990; Barber *et al.*, 1990). A variabilidade genética, resultante da heterogeneidade do genoma dos organismos, é facilmente ultrapassada nos ensaios com *Daphnia*, uma vez que a possibilidade de reprodução por partenogénese permite a obtenção de clones de indivíduos. Este modo de reprodução permite ainda distinguir a variabilidade devida à componente genética da que é provocada por factores ambientais (Soares *et al.*, 1991; 1992).

A variabilidade ambiental resultante de diferentes condições de cultura e manutenção dos organismos antes e durante os testes, inclui factores que podem ser facilmente controlados (e.g. temperatura e fotoperíodo) e outros cujo controlo é mais delicado (e.g. composição química do meio de cultura, quantidade e qualidade do alimento fornecido aos organismos) (Baird *et al.*, 1989a; Elendt e Bias, 1990; Soares e Calow, 1993).

Os meios de cultura utilizados para a cultura de *Daphnia* em laboratório podem ser classificados em naturais ou artificiais, consoante são obtidos directamente do meio natural, (normalmente água de lagos ou rios sujeita a filtração) ou são criados em laboratório através da preparação de soluções de compostos químicos em água. Os meios naturais apresentam normalmente flutuações sazonais na sua composição química e podem conter compostos

desconhecidos que podem interferir com a sensibilidade dos organismos e com a toxicidade do agente em estudo (Bradley *et al.*, 1993). Apresentam, no entanto, a vantagem de serem mais económicos e de preparação mais simples do que os artificiais (Baird *et al.*, 1989b). Os meios artificiais ou sintéticos, apesar de por vezes reduzirem o desempenho reprodutivo das fêmeas de *Daphnia* relativamente ao obtido com os meios naturais (Baird *et al.*, 1989b), apresentam a vantagem de possuir composição química conhecida, que é passível de ser reconstituída ou alterada sempre que necessário. Na escolha de um meio de cultura sintético deve ser considerada a sua composição química, uma vez que o excesso ou a redução de alguns nutrientes pode influenciar o desenvolvimento e a reprodução dos organismos (Leblanc e Surprenant, 1984; Elendt e Bias, 1990) e a presença de algumas substâncias pode influenciar a toxicidade do agente químico a testar (Guilhermino *et al.*, 1997).

O sucesso das culturas laboratoriais depende, para além da escolha de um meio de cultura adequado, da substituição do mesmo a intervalos de tempo regulares, de forma a garantir uma concentração de oxigénio suficiente para os organismos e remover os seus produtos de excreção (Adema, 1978). Para culturas de *D. magna* mantidas a 20°C, a renovação de meio a intervalos de 48 horas é suficiente para a obtenção de organismos saudáveis (Guilhermino, 1996). Durante a realização dos testes a remoção do meio tem ainda, como objectivo manter constante a concentração da substância testada (Adema, 1978).

O volume de meio de cultura a utilizar por cada *Daphnia* é função das necessidades de oxigénio dos organismos, que está dependente da espécie, da idade dos indivíduos, do seu estado fisiológico e do tipo de teste (com ou sem aerificação) (Adema, 1978).

O fornecimento de alimento em quantidade e qualidade adequada é outro dos componentes essenciais à obtenção de organismos saudáveis. O alimento vulgarmente utilizado para *Daphnia* são algas verdes (Chlorophyceae) das espécies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum*, obtidas a partir de culturas laboratoriais (Naylor *et al.*, 1992). As células em cultura apresentam variações na sua composição bioquímica que são função da idade (Stein, 1973). As culturas constituídas principalmente por células envelhecidas contêm uma quantidade maior de proteínas e menos lípidos do que as células obtidas de culturas no início da fase exponencial do crescimento (Baird *et al.*, 1989b). Os lípidos são importantes para o crescimento de *Daphnia*, principalmente na fase juvenil, e por isso devem utilizar-se, na preparação do alimento, algas obtidas de culturas que se encontrem na fase exponencial de crescimento.

Os indivíduos de *Daphnia* são particularmente sensíveis a alterações na quantidade de alimento. Um aumento ou redução na quantidade de alimento fornecida interfere com a

reprodução. A limitação de alimento reduz a fecundidade e o crescimento dos indivíduos mas o aumento da sua disponibilidade tem também efeitos negativos. Indivíduos de *D. magna* mudados subitamente para uma maior quantidade de alimento, apresentam um aumento significativo do período juvenil, e produzem juvenis de menores dimensões e de menor viabilidade (Baird *et al.*, 1989b). A cultura de *Daphnia* exige, por isso, o fornecimento de uma quantidade suficiente e constante de algas. É de evitar também manter culturas mistas, com indivíduos de diferentes idades, devido à possibilidade de competição diferencial pelos recursos alimentares (Baird *et al.*, 1989b).

Para a obtenção de organismos saudáveis deve ainda efectuar-se inspecções periódicas ao estado dos organismos, de forma a detectarem-se possíveis infecções por agentes patogénicos. A infecção pelo fungo *Aphanomyces* provoca problemas crónicos que levam à inibição e inviabilização da reprodução, podendo, em casos extremos provocar a morte dos organismos (Baird *et al.*, 1989b).

De um modo geral, é importante manter em todas as fases do ciclo de vida dos organismos um sistema de cultura controlado, com condições de temperatura, luz, meio de cultura e nutrição que permitam uma boa sobrevivência, crescimento e reprodução. Independentemente das condições de cultura adoptadas, é fundamental manter um ambiente constante antes e durante os testes, de forma que os efeitos provocados pela exposição ao tóxico não sejam alterados por efeitos resultantes da alteração das condições ambientais.

2.1.2. Locais de origem das espécies de *Daphnia* estudadas

Os cladóceros *D. pulex* e *D. pulicaria* utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de populações da lagoa de Mira e da lagoa do Viriato, respectivamente. Os indivíduos de *D. magna* utilizados pertenciam ao clone A (*sensu* Baird *et al.*, 1989a) e foram obtidos a partir de culturas mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Coimbra desde 1990.

A lagoa do Viriato está integrada no Parque Natural da Serra da Estrela, a uma altitude de 1560 metros. Trata-se de uma lagoa natural, represada em 1948, e que abastece de água a população da cidade da Covilhã. Tem uma área de, aproximadamente, 24 hectares e uma profundidade máxima de 20 metros. Apresenta-se num estado de oligotrofia, com baixa concentração de nutrientes de azoto e fósforo, de clorofila e níveis elevados de oxigénio na água (Barros *et al.*, 2000). Não existem registos da presença de cianobactérias (Boavida e Gliwicz, 1994; Barros *et al.*, 2000). A comunidade de crustáceos é geralmente dominada por copépodes, apresentando os cladóceros reduzida densidade e diversidade específica, tendo

sido encontrados apenas *Daphnia pulicaria* e duas espécies da família CHYDORIDAE (Barros *et al.*, 2000). De acordo com Valente e colaboradores (Valente *et al.*, 1994) a comunidade piscícola desta lagoa é pobre, sendo constituída essencialmente por truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

A lagoa de Mira está situada na região Centro-Litoral de Portugal, no concelho de Mira. Encontra-se sujeita a elevada pressão humana, uma vez que está envolvida por vários agregados populacionais, terrenos agrícolas e por um complexo turístico. Nas margens são abundantes as Gramíneas e diversas plantas aquáticas. Os nutrientes resultantes dos fertilizantes originários dos terrenos agrícolas circundantes, os engodos orgânicos utilizados na pesca desportiva que aqui se pratica, e a matéria orgânica originada a partir da decomposição da vegetação litoral contribuem activamente para a elevada concentração de nutrientes de azoto e fósforo na lagoa (Barros *et al.*, 1998a). A lagoa de Mira encontra-se eutrofizada e apresenta, ao longo de todo o ano, elevadas densidades de fitoplâncton. A comunidade fitoplanctónica é quase sempre dominada por cianobactérias, ocorrendo com especial incidência no período de verão, florescências de cianobactérias constituídas principalmente por *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spp.* (Vasconcelos, 1995a; Barros *et al.*, 1998a). A comunidade zooplanctónica é dominada pelos Rotíferos, sendo os género dominantes *Brachionus*, *Hexarthra* e *Polyarthra* (Barros *et al.*, 1998a). A comunidade de cladóceros é dominada por espécies de pequenas dimensões, sendo *Bosmina longirostris* a espécie dominante (Barros *et al.*, 1995). Ao longo do ano ocorrem também *Daphnia pulex* e *Ceriodaphnia pulchella* que são substituídas por *B. longirostris* quando as densidades de cianobactérias aumentam.

2.1.3. Cultura de *Daphnia*

2.1.3.1. Isolamento

Nas duas lagoas, a recolha dos cladóceros foi efectuada através de arrastos horizontais com uma rede para colheita de plâncton com malha de 55µm. Os indivíduos recolhidos foram colocados em frascos de plástico com água da lagoa e foram transportados para o laboratório em malas térmicas.

No laboratório procedeu-se ao isolamento de fêmeas adultas de cada local, sendo cada indivíduo colocado num recipiente de vidro com 120 ml de capacidade, com 100 ml de meio de cultura M4 (Elendt e Bias, 1990). Foram mantidas à temperatura de 20±1°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz: 8 horas de escuro (16hL:8hE) e alimentadas diariamente com

uma ração de $3,5x10^5$ células de *Chlorella vulgaris* por mililitro de meio. Cada fêmea isolada foi mantida em cultura até à libertação de três ou quatro ninhadas, sendo depois substituída por um dos juvenis libertados.

Os organismos isolados foram mantidos, nas condições de cultura referidas, aproximadamente durante três meses para que ocorresse a sua aclimatação às condições laboratoriais. Posteriormente, de cada local foi seleccionada, com base na sobrevivência e reprodução, uma fêmea, a partir da qual se iniciaram as culturas para obtenção dos organismos a utilizar nos testes.

A grande variabilidade de resultados existente entre testes de toxicidade com *Daphnia* é atribuída, entre outros aspectos, aos diferentes genótipos dos organismos utilizados (Baird *et al.*, 1989b; Elendt e Bias, 1990). Neste trabalho, optou-se por utilizar nos testes, para cada uma das espécies estudadas, indivíduos de um só clone, de forma a permitir a padronização e comparação de resultados entre os vários tipos de testes realizados. As condições de cultura em que os organismos do clone de *D. pulex* e o de *D. pulicaria* foram mantidos em laboratório foram suficientes para assegurar a sua reprodução por partenogénese.

2.1.3.2. Estrutura do sistema de cultura

Em laboratório mantiveram-se dois tipos básicos de culturas, as culturas de grupo com fêmeas adultas e com juvenis, que constituíam uma reserva de organismos e as culturas individuais que se destinaram a obter indivíduos para a realização dos testes.

Uma das culturas de grupo foi iniciada com indivíduos juvenis recém-nascidos e a outra cultura foi iniciada com fêmeas adultas (presença da primeira postura de ovos na câmara de incubação). Em ambos os casos os organismos eram mantidos até à libertação da 4ª postura, sendo depois reiniciadas as culturas. Deste modo, manteve-se um sistema de culturas contínuas com organismos de diferentes idades, que é importante para a disponibilização de organismos para os testes.

As culturas individuais, por permitirem o controlo mais rigoroso das fêmeas reprodutoras, foram mantidas para a obtenção de organismos para os testes. Foram iniciadas com juvenis com menos de 24 horas de idade provenientes da terceira ou quarta postura das fêmeas das culturas em grupo, que foram transferidos para recipientes individuais e mantidos até à libertação da quarta postura. Os juvenis libertados foram utilizados na realização dos ensaios.

2.1.3.3. Meio de cultura

O meio utilizado neste trabalho para a cultura de *Daphnia* foi o meio M4 (Elendt e Bias, 1990) cuja composição química se encontra referida na Tabela 2.1.1. As soluções de micronutrientes $Na_2EDTA.2H_2O$ e $FeSO_4.7H_2O$ foram preparadas individualmente, misturadas e autoclavadas imediatamente. A solução de Fe-EDTA assim obtida foi armazenada ao abrigo da luz directa. As soluções de macronutrientes $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, KCl, $NaHCO_3$ e $Na_2SiO_3.5H_2O$ foram preparadas semanalmente; as restantes soluções foram armazenadas por um período máximo de 2 meses após a sua preparação. As soluções de vitaminas foram preparadas individualmente, misturadas, filtradas através de um filtro com 0,2 μm de poro e guardadas congeladas, em recipientes individuais com 1 ml de capacidade.

As culturas em grupo de *D. pulex* e *D. pulicaria* foram efectuadas em recipientes de vidro, com um litro e meio de capacidade. Foram mantidos dez organismos num litro de meio M4, à temperatura de 20 ± 1°C e num fotoperíodo de 16 horas de luz: 8 horas de escuro, alimentados diariamente com $3{,}5x10^5$ células de *C. vulgaris* por mililitro de meio de cultura. A cultura de *D. magna* foi feita nas mesmas condições, mas os organismos foram alimentados com $5x10^5$ células de *C. vulgaris* por mililitro de meio de cultura. Em ambos os casos, o meio de cultura foi renovado a intervalos de 48 horas.

As culturas individuais efectuadas em recipientes de vidro com 100 ml de meio de cultura foram mantidas nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e alimentação referidas para as culturas em grupo.

2.1.3.4. Alimentação

A alga verde (Chlorophyceae) da espécie *Chlorella vulgaris*, que se encontra entre as espécies mais comuns utilizadas como alimento de qualidade para *Daphnia* (Baird *et al.*, 1989b; Naylor *et al.*, 1992), serviu de alimento durante a manutenção das culturas de cladóceros e nos testes realizados. A estirpe utilizada, CCAP 211/12, foi obtida no laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Ambiente e Vida, da Universidade de Coimbra. Foi cultivada em recipientes de vidro com 6 litros de capacidade com 4 litros de meio Z8 (Kotai, 1972) (Tabela 2.1.2.).

Tabela 2.1.1. Composição química do meio de cultura M4 (Elendt e Bias, 1990).

Composto químico	Concentração da solução (mg/l)
SOLUÇÕES DE MICRONUTRIENTES	
$Na_2EDTA.2H_2O$	2,5000
$FeSO_4.7H_2O$	0,9955
H_3BO_3	2,8595
$MnCl_2.4H_2O$	0,3605
$LiCl$	0,3060
$RbCl$	0,0710
$SrCl_2.6H_2O$	0,1520
$NaBr$	0,0160
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,0630
$CuCl_2.2H_2O$	0,0168
$ZnCl_2$	0,0130
$CoCl_2.6H_2O$	0,0100
KI	0,0033
Na_2SeO_3	0,0022
NH_4VO_3	0,0006
SOLUÇÕES DE MACRONUTRIENTES	
$CaCl_2.2H_2O$	293,80
$MgSO_4.7H_2O$	123,30
KCl	5,8000
$NaHCO_3$	64,800
$Na_2SiO_3.5H_2O$	10,000
$NaNO_3$	0,2740
KH_2PO_4	0,1430
K_2HPO_4	0,1840
VITAMINAS	
Tiamina-HCl	0,0750
Cianocobalamina (B_{12})	0,0010
Biotina	0,0008

Na preparação do meio Z8 utilizaram-se quatro soluções base (solução A, B, solução de Fe.EDTA e solução de elementos traço) cuja composição se refere na Tabela 2.1.2. Na preparação de um litro de meio de cultura utilizaram-se 10 ml das soluções A, B, e de Fe.EDTA e 1 ml da solução de elementos traço. A solução de Fe.EDTA foi preparada a partir de 10 ml/l de uma solução de $FeCl_3$ (preparada a partir de 2,8 g de $FeCl_3.6H_2O$ e 100 ml de HCl 0,1N) e de 9,5 ml/l de uma solução de Na.EDTA (constituída por 3,9 g de EDTA e 100 ml de NaOH 0,1 N). A solução de elementos traço foi preparada utilizando 10 ml/l das soluções 1 a 12 e 100 ml/l das soluções 13 e 14 (Tabela 2.1.2.). Após a sua preparação, as soluções A, B, Fe.EDTA e a solução de elementos traço, a água destilada e todo o material utilizado na preparação do meio de cultura, foram autoclavados, à temperatura de 120°C, durante uma hora e vinte minutos. As soluções foram armazenadas ao abrigo da luz. O manuseamento e a inoculação das culturas foi feito em condições assépticas. As culturas foram mantidas com arejamento e iluminação contínua, à temperatura de 20±1°C.

A produção de clorelina por *C. vulgaris* tem sido referida como um factor que pode influenciar negativamente o desenvolvimento de *Daphnia* (Lee *et al.*, 1986). A quantidade de clorelina produzida é diminuta durante a fase exponencial de crescimento, aumentando depois com a idade da cultura (Pratt *et al.*, 1945). De forma a minimizar os riscos associados à presença de clorelina, e também porque as algas apresentam variações na sua composição bioquímica consoante a idade da cultura (Baird *et al.*, 1989b), as culturas de *C. vulgaris* foram mantidas em fase exponencial de crescimento através da remoção de 3 litros de cultura e adição de igual volume de meio de cultura fresco a intervalos de aproximadamente 72 horas. A densidade da cultura foi controlada semanalmente por leitura da densidade óptica, a 440 nm, de uma amostra da cultura diluída a 1/10 e posterior conversão em número de células por mililitro utilizando uma relação previamente determinada.

No caso de contaminação das culturas, procedeu-se à sua eliminação e substituição por culturas iniciadas a partir de inóculos de reserva. Estes eram constituídos por 100 ml de cultura de *C. vulgaris* obtidos a partir de culturas em fase exponencial, mantidos em recipientes de 200 ml, à temperatura de 12°C e fotoperíodo 14 horas de luz: 8 horas de escuro.

Preparação de *C. vulgaris* como alimento

O volume de cultura em fase exponencial, retirado a intervalos de 72 horas, foi utilizado para preparação do alimento para *Daphnia*. Após centrifugação a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos, o meio de cultura foi removido e o sedimento (células) ressuspenso num pequeno volume de meio de cultura M4. A densidade da

Tabela 2.1.2. Composição química do meio de cultura Z8 (Kotai, 1972).

Composto químico	Concentração da solução (g/l)
SOLUÇÃO A	
$NaNO_3$	46,7
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	5,9
$MgSO_4.7H_2O$	2,5
SOLUÇÃO B	
K_2HPO_4	3,1
Na_2CO_3	2,1
SOLUÇÃO Fe.EDTA	
Solução de $FeCl_3$ (10 ml/l de solução)	
$FeCl_3.6H_2O$	2,8 g
HCl 0,1N	100 ml
Solução de Na.EDTA (9,5 ml/l de solução)	
EDTA	3,9 g
NaOH 0,1N	100 ml
SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO	
1. $Na_2WO_4.2H_2O$	0,330
2. $(NH_4)6Mo_7O_{24}.2H_2O$	0,880
3. KBr	1,200
4. KI	0,830
5. $ZnSO_4.7H_2O$	2,870
6. $Cd(NO_3)_2.4H_2O$	1,550
7. $Co(NO_3)_2.6H_2O$	1,460
8. $CuSO_4.5H_2O$	1,250
9. $NiSO_4(NH_4)2SO_4.6H_2O$	1,980
10. $Cr(NO_3)_3.9H_2O$	0,410
11. V_2O_5	0,089
12. $Al_2(SO_4)3K_2SO_4.24H_2O$	4,740
13. H_3BO_3	3,100
14. $MnSO_4.4H_2O$	2,230

suspensão de algas foi determinada pelo método referido para o controlo da densidade das culturas. O alimento foi guardado ao abrigo da luz, a 4°C, e utilizado durante um período máximo de três dias. O volume de suspensão a fornecer aos cladóceros como alimento foi calculado a partir do volume de cultura e da concentração da suspensão de *C. vulgaris* pretendida.

Ocasionalmente, algum do alimento preparado era congelado para ser utilizado posteriormente, caso surgissem problemas de contaminação com as culturas de algas. A utilização de *C. vulgaris* congelada como substituto do alimento fresco, para além de não

provocar efeitos negativos nos organismos (Cox *et al.*, 1992), constitui uma segurança contra eventuais problemas que possam surgir com as culturas de algas, durante a realização dos testes.

2.1.4. Cultura de *Microcystis aeruginosa*

2.1.4.1. Características gerais

M. aeruginosa Kützing emend. Elenkin é uma cianobactéria unicelular, que cresce normalmente em colónias, sendo a espécie mais comum em florescências tóxicas em Portugal (Vasconcelos, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1996). Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes da cianobactéria *M. aeruginosa*, IZANCYA 2, isolada da lagoa de Mira, a 13 de Abril de 1991, e IZANCYA 4, isolada da lagoa das Braças, a 10 de Junho de 1991 (Vasconcelos, 1995a).

A estirpe IZANCYA 4 apenas foi utilizada no teste efectuado com células intactas referido no capítulo 2.5. Uma vez que esta estirpe não apresenta toxicidade em bioensaios com murganhos até uma dose máxima de 1500 mg/kg (Vasconcelos, 1995a), foi utilizada neste trabalho como representativa de uma estirpe não tóxica. A estirpe IZANCYA 2 é hepatotóxica em bioensaios com murganhos, apresentando uma DL_{50} para esta espécie de 7,5 mg/kg (Vasconcelos, 1995a). Nesta estirpe foram isoladas três fracções tóxicas (Tabela 2.1.3.) que correspondem à presença de três tipos diferentes de microcistinas: microcistina-LA (MCYST-LA), microcistina-LR (MCYST-LR) e microcistina-[D-Asp^3]-LR (MCYST-[D-Asp^3]-LR). A estirpe IZANCYA 4 tem um diâmetro celular médio de 3,5 ± 0,3 μm e a estirpe IZANCYA 2 tem um diâmetro de 4,3 ± 0,5 μm (Vasconcelos, 1995a). Ambas as estirpes apresentaram as células em arranjo unicelular ou agregados de duas a quatro células nas culturas em laboratório.

Tabela 2.1.3. Composição da fracção tóxica da estirpe IZANCYA 2. Tipos de microcistinas, peso molecular, proporção das diferentes fracções e concentração (adaptado de Vasconcelos, 1995a).

Microcistinas	Peso molecular	Proporção das diferentes microcistinas (%)	Concentração (μg/mg)
MCYST-LR	995	94,5	4,73
MCYST-LA	910	4,7	0,23
MCYST-[D-Asp^3]-LR	981	0,8	0,04
Total		100	5,0

2.1.4.2. Condições de cultura

As duas estirpes de *M. aeruginosa* foram cultivadas em condições de meio de cultura, temperatura, arejamento e manuseamento idênticas às referidas anteriormente para a cultura de *C. vulgaris*. Em condições laboratoriais, as microcistinas são produzidas continuamente, apresentando, no entanto, uma concentração máxima por célula no fim da fase exponencial do crescimento, devido à sua acumulação no interior da célula (Watanabe *et al.*, 1989; Arment e Carmichael, 1996). As culturas foram mantidas em fase exponencial de crescimento, por remoção de 1 a 2 litros de cultura e adição de meio de cultura fresco a intervalos de aproximadamente 96 horas.

2.1.4.3. Preparação do extracto de *M. aeruginosa*

As toxinas purificadas e os extractos celulares são propícias ao estudo da toxicidade das cianobactérias para o zooplâncton, uma vez que a dose pode ser controlada e é independente do modo de alimentação dos organismos (DeMott e Dhawale, 1995). Na preparação do extracto de *M. aeruginosa* para utilização nos testes referidos nos capítulos 2.2, 2.3 e 2.4, utilizaram-se culturas de IZANCYA 2 na fase exponencial de crescimento. As culturas de IZANCYA 2 foram concentradas por centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos. As células de IZANCYA 2 assim recolhidas foram congeladas a –70°C, liofilizadas e conservadas a –20°C para posterior utilização.

A quantidade de toxina produzida pelas culturas de *M. aeruginosa* pode variar (Watanabe *et al.*, 1989; Utkilen e Gjølme, 1992). Tendo em vista aumentar a homogeneidade da composição dos extractos tóxicos utilizados nos diferentes testes, efectuaram-se várias culturas da estirpe IZANCYA 2. As células obtidas, depois de liofilizadas foram misturadas num almofariz, de forma a obter-se uma mistura homogénea em quantidade suficiente para a realização de todos os testes. Na preparação dos extractos, uma quantidade conhecida de células liofilizadas, ressuspensa em água destilada (normalmente na proporção de 10 mg de células por mililitro de água destilada) foi sujeita a dois períodos de congelação a –20°C, seguida de descongelação a 5°C. A amostra foi posteriormente sujeita a tratamento com ultra-sons num aparelho de ultra-sons (Microson ™ Ultra Cell Disruptor (Heat Systems Ultrasonics, Inc., N.Y.) durante 5 ciclos com 1 minuto de duração cada. As toxinas são resistentes aos ultra-sons (Meriluoto e Erikson, 1988), pelo que este processo pode ser utilizado para as remover das células. O homogeneizado obtido foi centrifugado, a 4000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante recolhido foi guardado a 5°C, ao abrigo da luz, e usado nos testes num período máximo de 24 horas. A concentração do extracto foi expressa em

termos do peso de células liofilizadas utilizadas na sua preparação (mg/ml).

2.1.4.4. Quantificação de microcistinas

Para quantificar a presença de microcistinas na solução base utilizada para a preparação dos extractos e na suspensão de células utilizadas para os testes referidos no capítulo 2.5., as células de *M. aeruginosa* presentes na suspensão foram rebentadas, utilizando um processo idêntico ao referido anteriormente para a preparação dos extractos. Antes de iniciada a quantificação de microcistinas, a solução obtida a partir das células e a solução de extracto foram filtradas, por um filtro com 0,45 μm de poro.

A concentração de microcistinas presentes nas células e nos extractos de *M. aeruginosa* utilizados nos testes foi determinada através de ensaio ELISA, utilizando o Envirogard^{Tm} Microcystins Plate Kit Cat. N° 75400, fornecido pela Comensoro Biotech, Madrid, e que utiliza a metodologia descrita por Chu *et al.* (1989; 1990). Este "conjunto de reacção"(kit) utiliza anticorpos policlonais que se encontram imobilizados nas paredes de uma microplaca e que se ligam às microcistinas ou a conjugados de microcistina-enzima. Em primeiro lugar, foram adicionados 100 μl da amostra e depois 100 μl da solução de conjugado microcistina-enzima, que compete com as microcistinas presentes na amostra para a ligação aos anticorpos. A solução de conjugado microcistina-enzima reage posteriormente com 100 μl de um substracto cromogénico, originando um composto com cor azul. Desta forma, a intensidade da cor obtida é inversamente proporcional à concentração de microcistinas presentes na amostra. A adição de 100 μl de uma solução de ácido clorídrico 1N interrompe a reacção e origina uma solução de cor amarela, cuja densidade óptica é lida a 450 nm. Para além das amostras, foram ainda tratadas de igual modo, um controlo negativo, constituído por MCYST-LR não tóxica, e três soluções padrão com 0,1, 0,4 e 1,6 ppb de MCYST-LR. As amostras, o controlo negativo e as soluções padrão foram determinados em duplicado. A concentração de microcistinas presente nas amostras foi determinada utilizando a equação da recta de regressão obtida a partir das leituras dos padrões e das respectivas concentrações.

2.2. Toxicidade aguda de *M. aeruginosa* em ovos, juvenis e adultos de *Daphnia*

2.2.1. Introdução

Microcystis aeruginosa é uma cianobactéria unicelular, colonial, da ordem das CHROOCOCALES, com distribuição geográfica cosmopolita, que se desenvolve vulgarmente em ambientes eutróficos e hipereutróficos de água doce, onde frequentemente atinge elevadas densidades e origina os chamados "blooms" ou florescências. As cianobactérias deste género são também as mais frequentemente associadas com florescências tóxicas.

As toxinas produzidas por *Microcystis* incluem-se no grupo das hepatotoxinas e são denominadas microcistinas. A microcistina-LR é frequentemente referida como a principal hepatotoxina encontrada nas estirpes de *M. aeruginosa* (Vasconcelos, 1995a).

Para além de *Microcystis,* espécies planctónicas de cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) e ainda cianobactérias terrestres do género *Hapalosiphon* podem também produzir microcistinas (Sivonen e Jones, 1999). No entanto, das cerca de sessenta microcistinas conhecidas, a maioria é produzida por espécies de *Microcystis* (Sivonen e Jones, 1999). Em Portugal, as microcistinas são também as toxinas dominantes, sendo produzidas principalmente por estirpes da espécie *M. aeruginosa* (Vasconcelos *et al.*, 1996).

As florescências de cianobactérias podem ser constituídas por uma ou por várias espécies, podendo ocorrer num mesmo local espécies e estirpes tóxicas e não tóxicas. Para além da variação que pode ocorrer na composição das espécies, uma mesma estirpe pode produzir

várias tipos de toxinas (Sivonen e Jones, 1999). A estirpe NRC 525-17 de *Anabaena flos-aquae* produz simultaneamente a neurotoxina anatoxina-a(s) (Matsunaga *et al.*, 1989) e várias microcistinas (Harada *et al.*, 1991). De um modo geral, as estirpes tóxicas de *Microcystis* produzem mais do que uma variante de microcistina, mas normalmente uma dada estirpe produz, predominantemente, uma ou duas microcistinas (Sivonen e Jones, 1999).

O objectivo de um teste de toxicidade aguda é a determinação da concentração de uma substância (químico ou efluente) ou a intensidade de um agente (e.g. temperatura, pH) que produz um efeito deletério num grupo de organismos durante uma exposição curta efectuada em condições controladas. A morte é uma resposta facilmente detectada sendo por esse motivo, o critério mais frequentemente utilizado. O critério indicativo de morte em testes com *Daphnia* é a imobilização ou ausência de movimento durante quinze segundos sob estímulo luminoso. A toxicidade expressa-se pelo valor da concentração letal a 50% (CL_{50}), parâmetro que indica a concentração de tóxico no meio que provoca a morte de metade dos indivíduos da população considerada nas condições experimentais utilizadas.

Os ensaios de toxicidade com cianobactérias e *Daphnia* podem ser realizados utilizando células intactas, homogeneizados de células, fracções de extractos de células ou toxinas purificadas (DeMott *et al.*, 1991; Jungmann e Benndorf, 1994; Jungmann, 1995). Os ensaios que utilizam células intactas não permitem separar os efeitos da interferência física das colónias ou dos filamentos com o aparelho filtrador, enquanto que os que utilizam homogeneizados totais ou parciais das células ou as toxinas puras permitem uma melhor avaliação da sensibilidade fisiológica dos organismos utilizados nos testes (DeMott *et al.*, 1991).

A sensibilidade das diferentes espécies de *Daphnia* às cianobactérias varia em função da espécie e da estirpe de cianobactéria considerada e consoante o modo de exposição utilizado (Hanazato, 1995). Grande parte dos trabalhos que têm sido publicados sobre o assunto não permitem a obtenção de valores de toxicidade de referência muito rigorosos, devido não só à existência de grandes diferenças de sensibilidade entre as espécies utilizadas, mas também porque utilizam metodologias e condições experimentais muito diversificadas. Por exemplo, para *D. pulex*, DeMott *et al.* (1991) referem uma DL_{50} às 48h para a MCYST-LR de 9,6 μg/ml, enquanto que Reinikainen *et al.* (1994) determinaram para a mesma espécie um valor de 0,001 μg/ml, que é aproximadamente quatro ordens de grandeza inferior.

2.2.2. Objectivos

Neste trabalho, avaliou-se a toxicidade aguda de um extracto de *M. aeruginosa* na sobrevivência dos ovos, juvenis e indivíduos adultos de *D. pulicaria*, *D. pulex* e *D. magna*. O principal objectivo deste estudo foi determinar a concentração de *M. aeruginosa* que produzia efeito letal nos organismos em estudo, tendo em vista a comparação da sensibilidade relativa das três espécies e também a avaliação das diferenças de sensibilidade existentes entre as diferentes fases do respectivo ciclo de vida. Pretendia-se ainda obter valores de toxicidade que pudessem servir de referência para a determinação das concentrações de *M. aeruginosa* a utilizar nos testes que se descrevem nos capítulos seguintes.

2.2.3. Material e Métodos

2.2.3.1. Testes com ovos

Os ovos partenogenéticos dos cladóceros podem ser cultivados *in vitro*, ou seja, no exterior da fêmea adulta e originam juvenis que não diferem morfologicamente nem em termos de capacidade reprodutiva daqueles que se desenvolvem dentro da câmara incubadora (Obreshkove e Fraser, 1940; Lei e Clifford, 1974; Kobayashi *et al.*, 1987; Parejko e Dodson, 1990; Ebert, 1993; Ohta *et al.*, 1998). Neste trabalho, foi utilizada a técnica de cultura dos ovos *in vitro* para avaliar a toxicidade aguda do extracto de *M. aeruginosa*.

Os ovos utilizados nestes ensaios foram obtidos a partir de fêmeas adultas de *D. pulicaria*, *D. pulex* e *D. magna* portadoras de terceiras ou quartas ninhadas recém passadas para a câmara incubadora. Os ovos encontravam-se nos estádios I ou II do desenvolvimento embrionário (Lei e Clifford, 1974), tendo sido retirados da câmara incubadora, por movimentação do corpo da fêmea no meio de cultura após afastamento das valvas da carapaça pela parte abdominal. Após a remoção, os ovos foram colocados em meio de cultura M4 e distribuídos posteriormente de forma aleatória pelas várias concentrações do extracto tóxico com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Nestes ensaios utilizaram-se recipientes de vidro com 50 ml de capacidade contendo 25 ml de solução teste. O extracto de *M. aeruginosa* foi preparado como foi referido na secção 2.1.4.3., tendo sido consideradas as seguintes concentrações de extracto (C_{ext}): 0,15; 0,23; 0,34; 0,51; 0,76 e 1,14 mg/ml. O tratamento controlo foi constituído apenas por meio de cultura M4. Foram utilizadas quatro réplicas por controlo e por tratamento com dez ovos cada.

O ensaio decorreu até à eclosão da totalidade dos ovos no tratamento controlo. O

critério de toxicidade adoptado foi a inviabilidade dos ovos durante o período de teste. A inviabilidade dos ovos foi confirmada, deixando os ovos nas soluções teste, durante um período de vinte e quatro horas após a conclusão do teste.

2.2.3.2. Testes com juvenis

Os juvenis de *D. pulicaria*, *D. pulex* e *D. magna* obtidos de terceiras ou quartas posturas de fêmeas mantidas individualmente segundo as condições descritas no ponto 2.1.3., foram isolados da progenitora num intervalo máximo de 24 horas após a sua libertação para o meio de cultura. Durante o processo de recolha, os juvenis foram colocados num recipiente com meio de cultura M4 e posteriormente distribuídos pelas soluções teste. Foram utilizadas cinco concentrações de extracto e um tratamento controlo constituído por meio M4. Foram usadas quatro réplicas por tratamento, com cinco indivíduos por 100 ml de solução teste.

As concentrações de extracto (C_{ext}) utilizadas no teste com juvenis de *D. pulex* foram 0,33; 0,50; 0,75; 1,10 e 1,70 mg/ml; com *D. pulicaria* foram 0,20; 0,30; 0,45; 0,68 e 1,01 mg/ml e com *D. magna*: 2,5; 3,1; 3,9; 4,9 e 6,1 mg/ml.

Os ensaios tiveram a duração de 48 horas, tendo sido adoptada a morte como critério indicativo de toxicidade, determinada pela ausência de movimentos dos indivíduos durante 15 segundos na presença de um estímulo luminoso.

2.2.3.3. Testes com indivíduos adultos

Para realização dos testes agudos com indivíduos adultos, foram utilizadas fêmeas de *D. pulicaria*, *D. pulex* e *D. magna* com a terceira postura de ovos recém passada para a câmara incubadora. Os ovos na câmara incubadora encontravam-se nos estádios I ou II do desenvolvimento embrionário (Lei e Clifford, 1974).

Os indivíduos adultos utilizados nos testes foram mantidos em culturas individuais até ocorrer a passagem dos ovos da terceira postura do oviducto para a câmara incubadora. Foram depois colocados juntos num recipiente com meio de cultura M4, sendo posteriormente distribuídos de forma aleatória pelas várias soluções testadas. Foram utilizadas cinco concentrações de extracto e um tratamento controlo constituído por meio M4. Foram efectuadas quatro réplicas por tratamento, constituídas por grupos de cinco indivíduos em 150 ml de solução teste. As concentrações de extracto(C_{ext}) utilizadas no teste com *D. pulex* foram 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/ml; no teste com *D. pulicaria* 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg/ml e no teste com *D. magna* 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/ml. A duração dos ensaios e o critério de toxicidade adoptados foram idênticos aos referidos para os testes agudos com os juvenis.

Todos os ensaios decorreram com fotoperíodo e temperatura idênticos aos utilizados nas culturas (secção 2.1.3.). Durante os testes não foram renovadas as soluções teste, não se forneceu alimento nem se efectuou o arejamento do meio. Para cada ensaio foram determinados os valores de pH e a concentração de oxigénio dissolvido no meio, nos vários tratamentos, no início e no final do ensaio.

A concentração de microcistinas presentes na solução de reserva usada na preparação das soluções teste foi determinada pelo método referido na secção 2.1.4.4.

2.2.3.4. Análise estatística

Os valores de CE_{50} para os testes agudos com os ovos e os de CL_{50} para os testes com os indivíduos juvenis e adultos foram determinados utilizando o método "probit" (Finney, 1971).

2.2.4. Resultados

Nos testes com ovos a concentração mínima de oxigénio dissolvido no meio registada foi 7, 44 mg/l (*D. magna* e C_{ext} = 0,76 mg/ml) e nos testes efectuados com juvenis foi 7,53 mg/l (*D. magna* e C_{ext} = 4,9 mg/ml). Nos testes com indivíduos adultos o valor mínimo registado foi 7,39 mg/l (*D. magna* e C_{ext} = 16 mg/ml). Nos três testes a diferença entre os valores médios de pH medidos no início e no final do teste foi sempre inferior a uma unidade.

A concentração de microcistinas medida nas soluções base utilizadas para preparar os extractos utilizados nos testes encontra-se na Tabela 2.2.1. O valor mais baixo encontrado foi de 0,55 μg MCYST/mg de células liofilizadas e o mais elevado 0,66 μg MCYST/mg de células liofilizadas.

Tabela 2.2.1. Concentração de microcistinas (μg MCYST/mg de células liofilizadas) determinada na solução base usada na preparação dos extractos utilizados nos testes agudos com ovos, juvenis e adultos de *D. pulex D. pulicaria* e *D. magna*. Os valores apresentados são a média de três determinações e o respectivo erro padrão.

Espécie	Ovos	Juvenis	Adultos
D. pulex	0,66 ± 0,05	0,61 ± 0,03	0,55 ± 0,05
D. pulicaria	0,66 ± 0,05	0,61 ± 0,03	0,55 ± 0,05
D. magna	0,66 ± 0,05	0,61 ± 0,04	0,61 ± 0,04

Os valores de CE_{50} e de CL_{50} obtidos após a exposição ao extracto de *M. aeruginosa* dos ovos, juvenis e indivíduos adultos de *D. pulex D. pulicaria* e *D. magna* encontram-se na Tabela 2.2.2.

Tabela 2.2.2. Valores de CE_{50} (mg/ml) obtidos nos testes agudos com os ovos e valores de CL_{50} às 48 horas, calculados a partir dos resultados com juvenis e adultos de *D. pulex D. pulicaria* e *D. magna*. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parêntesis.

Espécie	Ovos	Juvenis	Adultos
D. pulex	0,29	0,53	2,07
	(0,289 - 0,292)	(0,525 - 0,536)	(2,013 - 2,138)
D. pulicaria	0,27	0,46	1,48
	(0,269 - 0,275)	(0,436 - 0,485)	(1,432 - 1,523)
D. magna	0,34	4,34	5,31
	(0,342 - 0,346)	(4,317 - 4,373)	(5,168 - 5,457)

Foram encontradas diferenças de sensibilidade entre as três espécies e entre as várias fases do ciclo de vida consideradas, conforme indicado pelos valores de CE_{50} e Cl_{50} determinados.

Nas três espécies, os ovos foram o estádio do ciclo de vida que apresentou maior sensibilidade, seguidos por ordem decrescente pelos indivíduos juvenis e pelos adultos (Tabela 2.2.2.; Figuras 2.2.1. a 2.2.3.).

D. pulicaria apresentou-se como a espécie mais sensível e *D. magna* como a mais resistente, enquanto *D. pulex* revelou uma sensibilidade intermédia. Este padrão de

sensibilidade foi idêntico para os três estádios testados, isto é, ovos, juvenis e adultos (Figuras 2.2.1. a 2.2.3.).

Nos testes realizados com ovos, a sensibilidade das três espécies foi semelhante (Figura 2.2.1.). No teste com indivíduos juvenis e no teste com adultos, a sensibilidade de *D. pulicaria* e de *D. pulex* foi semelhante, apresentando *D. magna* uma sensibilidade muito inferior (Figuras 2.2.2. e 2.2.3.).

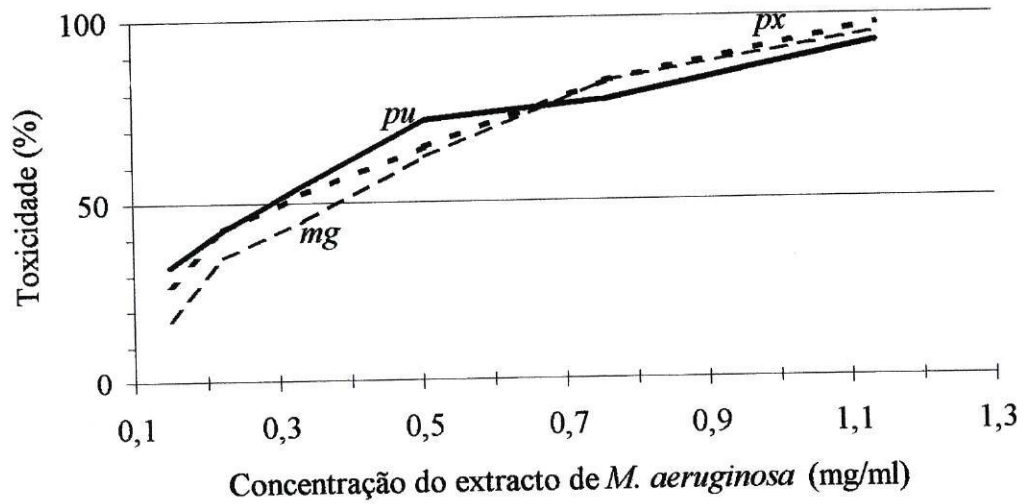


Figura 2.2.1. Toxicidade do extracto de *M. aeruginosa* para os ovos de *D. pulex (px)*, *D. pulicaria (pu)* e *D. magna (mg)*.

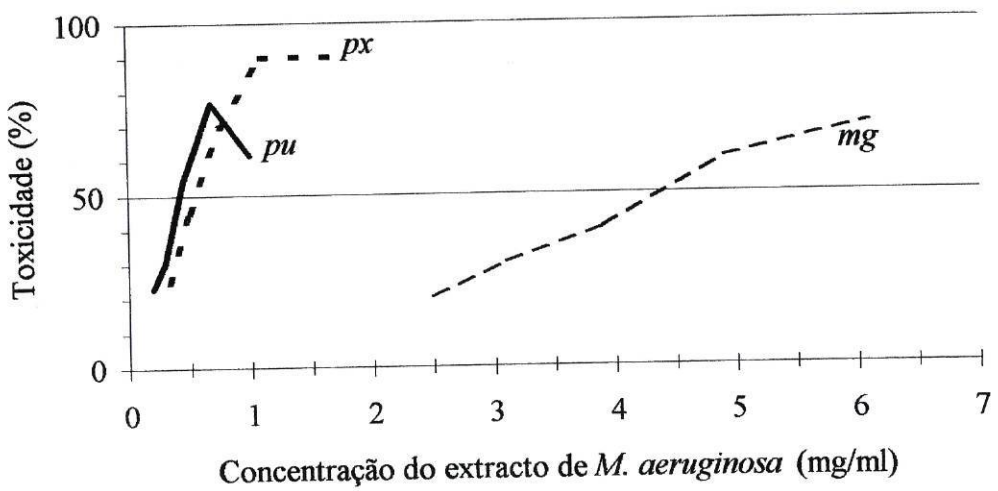


Figura 2.2.2. Toxicidade do extracto de *M. aeruginosa* para os juvenis de *D. pulex (px)*, *D. pulicaria (pu)* e *D. magna (mg)*.

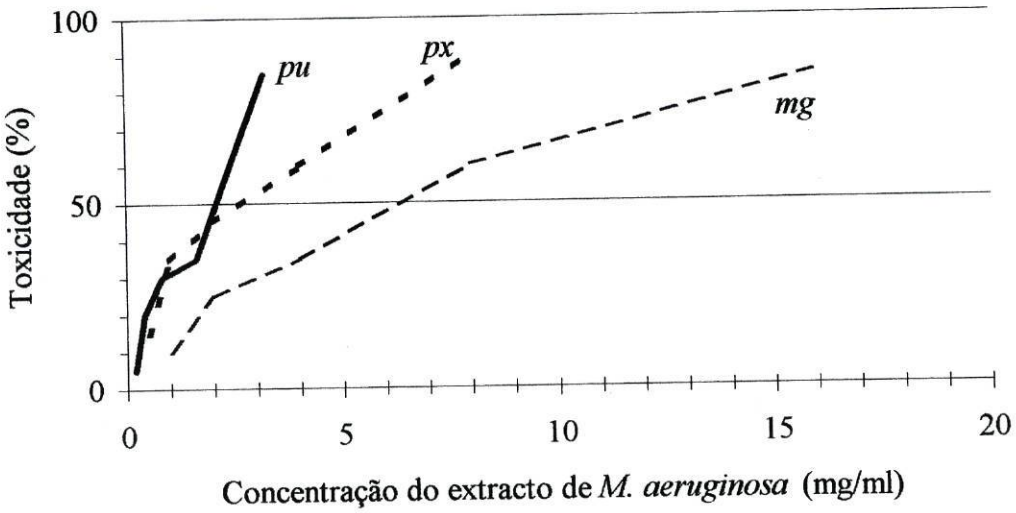


Figura 2.2.3. Toxicidade do extracto de *M. aeruginosa* para os indivíduos adultos de *D. pulex* (*px*), *D. pulicaria* (*pu*) e *D. magna* (*mg*).

2.2.5. Discussão

A realização dos testes agudos com a estirpe tóxica IZANCYA 2 de *M. aeruginosa* teve como objectivo a determinação de valores de toxicidade de referência para as três espécies de *Daphnia* em estudo. Pretendeu-se ainda avaliar as diferenças de sensibilidade entre organismos em diferentes estádios do ciclo de vida e, simultaneamente, conhecer a sensibilidade relativa das três espécies.

Os valores de oxigénio dissolvido no meio foram sempre superiores ao valor mínimo de 3 mg/l estabelecido pelas normas internacionais (OECD, 1993). A variação que ocorreu nos valores de pH registados no início e no final do teste foi inferior a uma unidade de pH.

Na estirpe de *M. aeruginosa* utilizada, Vasconcelos (1995a) refere um total de 5,0 μg de MCYST/mg, sendo 94,5 % de MCYST-LR, 4,7 % de MCYST-LA e 0,8 % de MCYST-[D-Asp^3]-LR. A concentração de microcistinas determinada nos extractos utilizados nos testes (Tabela 2.2.1.) foi inferior à quantidade referida cerca de uma ordem de grandeza. Tais diferenças podem ser devidas a uma menor eficiência do processo de extracção utilizado (Fastner *et al.*, 1998), ou resultarem de diferentes condições de cultura (Watanabe e Oishi, 1985).

Os indivíduos de diferentes idades, independentemente da espécie considerada, apresentaram diferenças de sensibilidade, sendo os indivíduos mais jovens os mais sensíveis. O estádio de ovo foi o mais sensível, seguido por ordem decrescente de sensibilidade, pelos

indivíduos juvenis e pelos adultos (Tabela 2.2.2.). A interferência negativa das cianobactérias no desenvolvimento dos ovos de *Daphnia* foi já referida por outros autores (Reinikainen *et al.*, 1995a; 1999). Nestes trabalhos, os ovos encontravam-se no corpo da fêmea e a exposição foi feita durante vários estádios, pelo que não permitiram distinguir entre o possível efeito directo das toxinas nos ovos e o aspecto negativo associado a factores nutricionais.

O desenvolvimento embrionário dos ovos que se encontravam em contacto directo com o extracto tóxico foi interrompido. Até ao momento, apenas é conhecido o mecanismo molecular que permite a entrada das microcistinas nos hepatócitos dos vertebrados através do sistema de transporte dos sais biliares (Weckesser e Martin, 1990). As microcistinas podem, no entanto, causar alterações noutros tipos de células. Fibroblastos humanos, células humanas do endotélio, células epiteliais humanas e promielócitos de rato apresentaram alterações na membrana celular, contracção celular, redistribuição de organelos e condensação da cromatina após exposição a microcistinas (McDermott *et al.*, 1998). Os hepatócitos sofrem alterações semelhantes, necessitando no entanto de um tempo de exposição menor, fazendo supor diferentes mecanismos de entrada das toxinas nas células (McDermott *et al.*, 1998). Na carpa, a morte devida a microcistinas, para além da hepatotoxicidade foi também atribuída a perturbações da homeostasia iónica (Carbis *et al.*, 1996) que têm como consequência alterações da permeabilidade das membranas (Forsteath, 1992) e dificuldades na regulação da pressão osmótica (Hoffman, 1970). Fastner e colaboradores (Fastner *et al.*, 1995) utilizando hepatócitos de rato e uma linha de células de ovário de "hamster" (CHO-K1) para distinção de outro tipo de toxicidade, verificaram que os extractos com microcistinas causavam danos no citoesqueleto e aumentavam a permeabilidade das células a outras substâncias. Estes resultados foram atribuídos à presença de outras substâncias que apresentavam reacção aditiva ou sinergística com as microcistinas. Para além das microcistinas, tem sido várias vezes referida a presença nas cianobactérias de outros compostos tóxicos para *Daphnia* (Nizan *et al.*, 1986; Klapes, 1990; Jungmann *et al.*, 1991; Jungmann, 1992; Jungmann e Benndorf, 1994; Jungmann, 1995; Reinikainen *et al.*, 1995b). Para além das cianobactérias, outros elementos do fitoplâncton, nomeadamente as Diatomáceas, podem conter compostos com capacidade de inibir o desenvolvimento embrionário de elementos do zooplâncton (Miralto *et al.*, 1995).

Assim, através da alteração da permeabilidade das membranas, associadas ou não a efeitos sinergísticos ou aditivos com outros compostos, as toxinas presentes no extracto de *M. aeruginosa* podem ter entrado nos ovos e promovido a sua inviabilização. Existe, ainda, a possibilidade da presença de outros compostos tóxicos para os ovos com características mais

lipofílicas do que a MCYST-LR.

Durante o desenvolvimento embrionário dos ovos partenogenéticos de *Daphnia*, ocorre a perda das membranas que revestem o ovo externamente, estando este processo associado ao aumento de tamanho do embrião (Green, 1956; Lei e Clifford, 1974; Zaffagnini, 1987). A membrana externa, que é a mais espessa, é libertada entre o estádio II e III (Lei e Clifford, 1974). No decorrer da exposição ao tóxico, os ovos em desenvolvimento, ao libertarem as membranas envolventes podem ter ficado mais permeáveis às toxinas do meio, permitindo a sua entrada e levando à interrupção do seu desenvolvimento.

Neste estudo, para as três espécies testadas, as formas jovens foram mais afectadas do que os adultos. Maior sensibilidade dos indivíduos juvenis foi também encontrada por Lampert (1981b), que verificou que *M. aeruginosa* era tóxica não só para os indivíduos recém-nascidos de *D. pulicaria*, mas também para os juvenis com quatro e seis dias de idade. Além disso, este autor sugere que a sobrevivência dos juvenis aumenta com a idade. Juvenis de *D. magna* expostos a uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa* também se revelaram mais sensíveis do que os indivíduos pré-adultos (Nizan *et al.*, 1986). De modo geral, os organismos imaturos ou jovens são mais susceptíveis aos agentes químicos do que os organismos adultos (Rand e Petrocelli, 1984). A sensibilidade relativa de juvenis e adultos de *Daphnia* pode variar, dependendo da concentração de cianobactérias considerada e da concentração de alimento disponível (Reinikainen *et al.*, 1994). Ensaios efectuados com juvenis com menos de vinte e quatro horas de idade e fêmeas adultas de *D. pulex* alimentadas com diferentes concentrações de células de *M. aeruginosa* e de *Scenedesmus sp.*, registaram uma melhor sobrevivência dos indivíduos juvenis relativamente aos adultos quando em presença de baixas quantidades de cianobactérias (Reinikainen *et al.*, 1994). Na presença de quantidades muito elevadas de cianobactérias, os juvenis foram os mais sensíveis. Os juvenis sobreviviam mais do que os adultos para baixas concentrações de *Scenedesmus* mas apresentavam tempos de sobrevivência inferiores aos adultos para níveis altos de *Scenedesmus* (Reinikainen *et al.*, 1994). A menor sensibilidade dos juvenis relativamente aos adultos pode ser explicada se considerarmos que as reservas lipídicas que os juvenis recém libertados são portadores, tornam-nos fisiologicamente mais tolerantes á ausência de alimento (Goulden e Hornig, 1980; Tessier e Goulden, 1982) e consequentemente mais resistentes às toxinas. Sobrevivência similar de indivíduos adultos e juvenis de *D. pulex* na presença de células de *M. aeruginosa* foi também registada por Sbiyyaa *et al.*, (1998). Neste trabalho, durante a exposição ao extracto tóxico, não foi fornecido alimento e os estádios mais jovens foram os mais sensíveis.

De acordo com Tessier e Goulden (1982), as reservas lipídicas de um organismo permitem prever a sua sensibilidade ao "stress" ambiental, provocado, por exemplo, por exposição a tóxicos e pelo jejum. Os cladóceros adultos apresentam flutuações na quantidade de reservas lipídicas que estão associadas às várias fases do seu ciclo reprodutivo. As reservas lipídicas apresentam o seu valor mais baixo logo após a passagem dos ovos partenogéneticos do ovário para a câmara de incubação e aumentam progressivamente durante os estádios seguintes do desenvolvimento do ovo, até serem incorporadas no ovário, onde são usadas na produção dos ovos da postura seguinte.

Nos ensaios realizados, os indivíduos adultos foram mais resistentes do que os juvenis, apesar de se encontrarem provavelmente numa fase de grande sensibilidade. Os ovos encontravam-se nos estádios I a II do seu desenvolvimento quando as fêmeas contactaram com as toxinas, ou seja, numa fase em que as reservas lipídicas ainda não estavam repostas. A aquisição de novas reservas esteve também dificultada, pois os ensaios decorreram na ausência de alimento. Ao avaliar a sensibilidade dos indivíduos na fase adulta e ao estabelecer comparações com outros estádios ou entre indivíduos adultos de diferentes espécies, é necessário considerar as variações de sensibilidade que podem estar associadas com a disponibilidade de reservas energéticas dos indivíduos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem ainda detectar diferenças interespecíficas. A espécie mais sensível foi *D. pulicaria* e *D. magna* a mais resistente, enquanto *D. pulex* apresentou uma sensibilidade intermédia. Vários estudos têm comparado a susceptibilidade de diferentes espécies de cladóceros a cianobactérias tóxicas. Lampert (1981a; 1982) refere que uma estirpe de *M. aeruginosa* era tóxica para várias espécies de cladóceros e notou que a sensibilidade aumentava com o tamanho do corpo. Gilbert (1990) registou um padrão semelhante num trabalho efectuado com sete espécies de cladóceros e *Anabaena affinis* e verificou que *D. magna* era a espécie mais sensível. Fulton (1988b) refere a estirpe de *M. aeruginosa* (PCC7820) como sendo tóxica para *D. parvula* e *Moina micrura* mas não para *Bosmina longirostris*. Fulton (1988a) também verificou que uma estirpe de *Anabaena flos-aquae* (NRC-44-1) era tóxica para *D. pulex*, *D. parvula*, *Diaphanosoma brachyurum* e *Moina micrura* mas não para *Bosmina longirostris*. A actividade das fosfatases proteicas 1 e 2A de *D. pulex* é cerca de dez vezes menos sensível à inibição pela MCYST-LR do que as de *D. pulicaria* (DeMott e Dhawale, 1995). Igual diferença de sensibilidade foi detectada por DeMott *et al.* (1991) ao estudarem os efeitos da MCYST-LR na sobrevivência

das mesmas espécies. Neste trabalho, *D. magna*, a espécie de maior dimensão foi a menos sensível.

No estádio de ovo, os valores de CE_{50} das três espécies foram muito semelhantes. Os juvenis foram o estádio que apresentou maiores diferenças entre as espécies, apresentando *D. magna* um valor de CL_{50} de 4,34 mg/ml, cerca de dez vezes superior ao apresentado por *D. pulicaria* (0,46 mg/ml). A semelhança de sensibilidade dos ovos das três espécies pode dever-se ao facto de estes corresponderem a um estádio em que os organismos se encontram pouco diferenciados, e em que provavelmente os aspectos responsáveis pelas diferenças de sensibilidade exibidas posteriormente pelos indivíduos mais velhos ainda não estão estabelecidos

As fêmeas de *D. pulex* e de *D. pulicaria* com que se iniciaram as culturas laboratoriais e que originariam os indivíduos utilizados nos testes foram recolhidas de dois locais com diferentes graus tróficos, e que apresentam ao longo do ano concentrações muito diferentes de cianobactérias. *D. pulicaria* foi obtida num lago oligotrófico da Serra da Estrela, onde as cianobactérias estão ausentes (Barros *et al.*, 2000). *D. pulex* foi obtida na lagoa de Mira, um lago classificado como eutrófico desde 1960 (Nauwerck, 1960), e que apresenta, durante todo o ano, elevadas densidades de cianobactérias sendo *M. aeruginosa* a espécie dominante (Barros *et al.*, 1998a). A diferente sensibilidade exibida pelas espécies pode ser uma consequência das diferentes pressões exercidas pelas condições particulares de cada ecossistema de origem. É provável que, num ecossistema onde as cianobactérias são frequentes, as espécies e os clones de cladóceros melhor adaptados e com maior resistência fisiológica às suas toxinas tenham atingido maior desenvolvimento. Segundo DeMott *et al.* (1991), *D. pulicaria* isolada de um lago que vulgarmente apresentava grandes densidades de cianobactérias apresentou maior taxa de sobrevivência do que *D. pulex* isolada de um charco onde estas eram muito raras. Esta capacidade foi atribuída a uma menor sensibilidade fisiológica à toxina pura e à inibição da alimentação na presença de células tóxicas de *M. aeruginosa*, sendo sugerido que as diferenças de sensibilidade encontradas entre as duas espécies reflectiam a sua diferente exposição às cianobactérias tóxicas. Uma estirpe de *D. pulex* isolada de uma comunidade com *Anabaena affinis* mostrou-se resistente às toxinas, podendo a resistência resultar de um processo de adaptação (Gilbert 1990).

Os indivíduos de *D. magna* apresentaram menor sensibilidade, apesar de serem originários de culturas mantidas há muitos anos em laboratório e, portanto, sem contacto prévio com cianobactérias. Das três espécies estudadas *D. magna* é, no entanto, a que se encontra há mais tempo nas condições ambientais em que foram realizados os ensaios. Nos

ensaios com *Daphnia*, as condições ambientais em que são mantidos os organismos antes e durante os ensaios de toxicidade influenciam a sua sensibilidade (Baird *et al.*, 1989b; Soares *et al.*, 1991). Neste trabalho, *D. magna* encontrava-se, melhor adaptada às condições em que foram realizados os ensaios do que *D. pulicaria* e *D. pulex*, embora estas tenham também sido submetidas a um período de aclimatação de alguns meses, antes da realização dos ensaios.

As diferenças de sensibilidade aos compostos tóxicos entre diferentes espécies de *Daphnia* têm sido relacionadas com o tamanho dos indivíduos. O tamanho do corpo é um factor importante que pode influenciar a acumulação de substâncias tóxicas pelos organismos (Boyden, 1974; Krantzberg, 1989). Nos organismos de pequenas dimensões o quociente entre a área da superfície e o volume do corpo é maior que nos organismos maiores, o que proporciona uma taxa de entrada das substâncias tóxicas nos indivíduos mais elevada (Krantzberg, 1989). Em estudos comparativos entre espécies de cladóceros, *D. magna* mostrou-se menos sensível a substâncias tóxicas do que outras espécies, o que foi em parte atribuído a diferenças de dimensões (Koivisto, 1995). A comparação da sensibilidade de diferentes espécies de *Daphnia* mostrou que os organismos de maiores dimensões tinham tendência para ser mais tolerantes a substâncias tóxicas do que outros elementos do zooplâncton de menores dimensões (Winner e Farrell, 1976; Takahashi *et al.*, 1987; Koivisto *et al.*, 1992).

As cianobactérias no meio natural podem alterar a estrutura da comunidade zooplanctónica, eliminando as populações de *Daphnia* de maiores dimensões e fazendo com que os cladóceros mais pequenos e os rotíferos passem a dominar (Gliwicz, 1977; Infante e Riehl, 1984; Gilbert, 1990; Barros, 1994). Estas mudanças, que afectam principalmente os cladóceros de maiores dimensões, são atribuídas ao efeito directo das toxinas e aos efeitos negativos resultantes da interferência física das colónias ou filamentos com o aparelho filtrador (Lampert, 1981a; 1982; DeMott *et al.*, 1991). A avaliação da sensibilidade interespecífica de *Daphnia* em relação às cianobactérias deve, por isso, ser feita tendo em consideração a forma como as cianobactérias se apresentam (toxinas dissolvidas, células isoladas ou colónias), uma vez que este aspecto pode ser o responsável pela inibição diferencial das espécies. Nos ensaios agudos realizados foram utilizados extractos e por isso o aspecto da interferência física foi eliminado. As diferenças de sensibilidade encontradas entre as espécies podem, assim, entre outros aspectos estar relacionadas com as diferentes capacidades de entrada das toxinas no corpo.

Ensaios agudos com *M. aeruginosa* e várias espécies de *Daphnia* foram já efectuados por outros autores (DeMott *et al.*, 1991; Barros, 1994; Reinikainen *et al.*, 1994; Sbiyyaa *et al.*,

1998). No entanto, devido à diversidade de condições experimentais, é extremamente difícil conseguir relacionar os valores de toxicidade obtidos anteriormente com os registados neste trabalho. *D. pulex*, na presença de um extracto aquoso feito a partir de material recolhido de uma florescência de *M. aeruginosa*, apresentou um valor de CL_{50} de 0,938 mg/ml e uma CL_{50} de 0,154 mg/ml na presença de um extracto feito a partir de uma estirpe cultivada em laboratório (Sbiyyaa *et al.*, 1998). Os valores de CL_{50} encontrados neste trabalho para *D. pulex* foram de 0,53 mg/ml para os juvenis e de 2,07 mg/ml para os adultos. Estes valores encontram-se dentro do intervalo referido por Sbiyyaa *et al.* (1998), não sendo, no entanto, possível estabelecer outras relações pois não é referido no trabalho qual a idade dos indivíduos utilizados nos ensaios. Num trabalho anterior, realizado com o mesmo clone de *D. magna* e um extracto preparado a partir de uma estirpe diferente de *M. aeruginosa*, obteve-se um valor de CL_{50} às 48 horas de 4,77 mg/ml para os indivíduos adultos e um valor de CL_{50} de 3,83 mg/ml para juvenis (Barros, 1994). Nos ensaios realizados neste estudo, os valores foram inferiores ao anteriormente referido, provavelmente devido à diferente toxicidade da estirpe de *M. aeruginosa* utilizada, uma vez que os organismos utilizados pertenciam ao mesmo clone de *D. magna* e as condições de preparação dos extractos e de realização dos ensaios foram semelhantes.

Num ensaio agudo com indivíduos adultos de *D. pulex* expostos à acção da MCYST-LR, DeMott *et al.* (1991) obtiveram um valor de CL_{50} de 9,6 μg/ml. Células da mesma espécie de cianobactéria fornecidas a indivíduos de *D. pulex* originaram um valor de CL_{50} às 48 horas, de apenas 0,001 μg de MCYST-LR /ml (Reinikainen *et al.*, 1994). Estes dois resultados apresentam uma diferença de cerca de quatro ordens de grandeza e evidenciam a diferença de toxicidade existente entre células e toxinas puras, que pode ser devido à presença de outros compostos tóxicos para *Daphnia* para além das microcistinas.

A concentração de microcistinas (μg MCYST/mg de células liofilizadas) determinada na solução de reserva usada na preparação dos extractos (Tabela 2.2.1.) e os valores de CE_{50} e de CL_{50} (Tabela 2.2.2.) foram utilizados para calcular os valores de CE_{50} e de CL_{50} às 48 horas, em termos do teor de microcistinas (Tabela 2.2.3.), de modo a permitir a comparação dos resultados deste trabalho com outros em que se utilizaram toxinas puras.

Os indivíduos adultos de *D. pulex* apresentaram um valor de CL_{50} de 1,13 μg MCYST/ml (Tabela 2.2.3.) que é cerca de nove vezes inferior ao registado por (DeMott *et al.*, 1991) e superior em três ordens de grandeza ao registado por Reinikainen *et al.* (1994). No mesmo trabalho, a CL_{50} às 48 horas para indivíduos adultos de *D. pulicaria* foi de 21,4 μg/ml. O valor de toxicidade encontrado no presente trabalho foi de 0,81 μg/ml, que é cerca de vinte

e seis vezes inferior ao anteriormente referido. Yasuno e Sugaya (1991) referem para juvenis de *D. magna* sujeitos a um extracto contendo MCYST-LR e MCYST-YR uma CL_{50} superior a 8 mg/l, que é três vezes superior ao valor de toxicidade encontrado neste trabalho (CL_{50} 48 h = 2,65 μg/ml).

Tabela 2.2.3. Valores de CE_{50} (μg MCYST/ml) obtidos nos testes agudos para os ovos e valores de CL_{50} (μg MCYST/ml) às 48 horas, calculados a partir dos resultados com juvenis e adultos de *D. pulex*. *D. pulicaria* e *D. magna*.

Espécie	Ovos	Juvenis	Adultos
D. pulex	0,19	0,32	1,13
D. pulicaria	0,18	0,28	0,81
D. magna	0,22	2,65	3,24

As diferenças encontradas entre os vários trabalhos referidos anteriormente podem ser atribuídas a uma grande variedade de factores, que podem estar associados com diferenças na toxicidade das estirpes de *M. aeruginosa* utilizadas, com diferentes sensibilidade dos clones de *Daphnia* ou ainda com diferentes condições ambientais, antes e durante o ensaio, o que torna extremamente difícil proceder a comparações.

2.3. Toxicidade de *M. aeruginosa* durante a oogénese e desenvolvimento embrionário de *Daphnia*

2.3.1. Introdução

Os cladóceros do género *Daphnia* reproduzem-se por partenogénese cíclica, que é caracterizada pela ocorrência de várias gerações partenogenéticas que alternam com a reprodução sexuada (Zaffagnini, 1987). A duração do período partenogenético depende de factores ambientais tais como fotoperíodo, densidade e limitação de alimento que podem actuar como estímulo para o início da reprodução sexuada e produção de efípios (Stross, 1969; 1971; Carvalho e Hughes, 1983). Durante a maior parte do tempo, as populações são compostas por fêmeas partenogenéticas, que produzem ovos diplóides não fertilizados que se desenvolvem na câmara de incubação, originando novas fêmeas partenogenéticas geneticamente idênticas à progenitora. Em certas alturas do ano, quando as condições ambientais se tornam menos favoráveis, os ovos desenvolvem-se e originam machos que fertilizam ovos haplóides. A parede da câmara de incubação à volta do ovo fertilizado endurece e fica mais espessa, formando uma cápsula escura. O efípio (do inglês ephippium) formado é libertado para o meio quando a fêmea muda a carapaça. Os efípios são resistentes à desidratação e ao congelamento e o embrião permanece em diapausa até que ocorram condições ambientais adequadas ao seu desenvolvimento.

O aparelho reprodutor de *Daphnia* apresenta dois ovários com parede fina, dispostos ao longo de todo o tórax, lateralmente ao intestino, e o oócito em crescimento, desenvolve-se em extenso contacto com a parede do ovário (Zaffagnini, 1987). O oviducto é um tubo curto, delimitado por uma membrana íntima quitinosa que é contínua com a cutícula do corpo

(Zaffagnini, 1987) e está separado do ovário por um estrutura de oclusão que abre durante a passagem dos ovos para a câmara incubadora (Rossi, 1980).

O desenvolvimento dos ovos partenogenéticos envolve um ciclo com três estádios, que se inicia com a formação do oócito no ovário (oogénese) e termina com a libertação dos juvenis da câmara de incubação (Zaffagnini, 1987; Bradley *et al.*, 1991). A oogénese e a diferenciação dos oócitos a partir de células germinativas ocorre na primeira fase do primeiro estádio (F1). A atribuição de reservas maternas aos oócitos e a formação do vitelo (vitelogénese) ocorrem no estádio seguinte (F2), pelo que, é nesta fase que ocorre o maior desvio de energia da progenitora para a reprodução. A deposição dos ovos na câmara de incubação e a embriogénese ocupam o terceiro estádio (F3). Após esta fase os ovos ficam nutricionalmente independentes da progenitora. Os processos que ocorrem nas três fases referidas acontecem no período compreendido entre duas mudas.

O desenvolvimento embrionário dos ovos na câmara de incubação pode ser dividido em oito estádios (Green, 1956; Lei e Clifford, 1974). No primeiro estádio os ovos são opacos ou translúcidos e com margens transparentes. No estádio II, os ovos apresentam margens transparentes com aspecto granular e uma invaginação que corresponde à futura região cefálica. No estádio III, já é perceptível a forma de embrião, embora a cabeça ainda não esteja definida. Na parte final do estádio as futuras antenas, surgem como segmentos curtos, bifurcados, localizados junto ao corpo. No estádio IV, é visível uma protuberância cefálica, as antenas estão mais longas mas ainda se encontram junto ao corpo e surgem os primórdios dos apêndices abdominais. Na fase V surgem dois olhos pequenos, com tonalidade rosa. Na fase VI o embrião surge com dois olhos acastanhados e com o corpo completamente coberto pela carapaça. Na fase VII, os olhos estão muito desenvolvidos, pretos e mais próximos um do outro. A porção distal das antenas separa-se do corpo. Na fase VIII, o embrião só apresenta um olho e ocorre todo o subsequente desenvolvimento até o embrião adquirir o aspecto de um adulto. Durante o desenvolvimento embrionário ocorre ainda a libertação de duas membranas que revestem o ovo. A membrana externa do ovo é libertada entre o fim do estádio II e início da fase III e a membrana interna entre as fases VII e VIII (Lei e Clifford, 1974). No desenvolvimento *in vitro* dos ovos de *D. pulex* foram registadas três membranas a envolver o ovo. A terceira membrana detectada, a mais interna, é libertada na parte final do desenvolvimento embrionário quando ocorre a extensão da espinha caudal (Esslova, 1959).

No fim do desenvolvimento embrionário a libertação dos juvenis da câmara de incubação

para o exterior antecede a muda, que corresponde à libertação do exoesqueleto ao que se segue o crescimento da fêmea adulta enquanto a nova carapaça ainda é elástica. Finalmente ocorre a passagem de uma nova postura de ovos do ovário para a câmara de incubação e reinicia-se o ciclo.

Vários trabalhos referem a diminuição do número de descendentes libertados por indivíduos de *Daphnia* na presença de cianobactérias (Hietala, 1996; Hietala *et al.*, 1995; 1997; Reinikainen *et al.*, 1994; 1995a; 1999; DeMott *et al.*, 1991; Repka, 1998). No entanto, apenas um reduzido número refere a libertação de ovos ou embriões com o desenvolvimento incompleto ou abortado (Reinikainen *et al.*, 1995a; Barros *et al.*, 1998b; Nogueira, 1999). Apesar da importância das fases de formação e desenvolvimento dos ovos no sucesso reprodutivo de *Daphnia*, desconhece-se ainda qual o efeito das cianobactérias a este nível.

2.3.2. Objectivos

Neste trabalho, utilizando *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*, foram avaliados os efeitos de um extracto produzido a partir da estirpe tóxica de *M. aeruginosa* (IZANCYA 2) induzidos nos ovos em desenvolvimento na câmara incubadora e nos ovos em processo de formação no ovário.

Este estudo teve como objectivo, avaliar se o extracto tóxico de *M. aeruginosa* pode afectar os ovos em desenvolvimento na câmara incubadora. A verificar-se esta hipótese, tal corresponderia a um efeito directo das toxinas nos ovos, pois após a sua passagem para a câmara incubadora os ovos estão fisiologicamente isolados da progenitora (Green, 1956) e em contacto directo com o meio externo (Baird *et al.*, 1991). Pretendeu-se ainda verificar se os ovos que se encontram no ovário em diferentes fases de desenvolvimento também são afectados pelo extracto de *M. aeruginosa*. Neste caso, o tóxico para atingir os ovos teria que atravessar a carapaça e o corpo da fêmea ou atingir os ovos após ingestão e transporte no tubo digestivo da fêmea.

2.3.3. Material e Métodos

2.3.3.1. Condições gerais

Juvenis de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*, com menos de 24 horas de idade isolados de uma cultura em grupo efectuada como foi referido na secção 2.1.3., foram mantidos em cultura até ao aparecimento da primeira postura de ovos na câmara incubadora.

Foram colocados 10 organismos por litro de meio M4 para *D. magna* e 20 organismos por litro de meio para as outras duas espécies, à temperatura de 20 ± 1°C, sob um fotoperíodo de 16 horas de luz: 8 horas de escuro. Os organismos foram alimentados diariamente com *C. vulgaris*. As espécies *D. pulex* e *D. pulicaria* receberam uma ração diária de 3,5 $x10^5$ células/ml, enquanto que *D. magna* recebeu uma ração diária de $5x10^5$ células/ml. O meio de cultura foi renovado a intervalos de 48 horas.

Neste trabalho utilizou-se o planeamento experimental sugerido por Baird *et al.* (1991), que envolve a submissão a um extracto tóxico, durante um estádio completo (intervalo entre duas mudas), de indivíduos que transportam ovos.

Logo após a passagem da primeira postura de ovos do ovário para a câmara incubadora, as fêmeas foram distribuídas pelo controlo e pelos diferentes tratamentos, constituídos por diferentes concentrações de um extracto tóxico de *M. aeruginosa*. As fêmeas foram mantidas nestas condições até à libertação da primeira postura para o exterior. Posteriormente, foram colocadas em meio de cultura sem tóxico e mantidas até à libertação dos juvenis da quarta postura. Tendo em vista a sincronização do estado de desenvolvimento embrionário dos ovos, apenas foram utilizadas fêmeas cujos ovos foram libertados para a câmara incubadora num intervalo máximo de 3 horas, correspondendo assim a ovos no estádio I do desenvolvimento embrionário (Green, 1956; Lei e Clifford, 1974). Os ovos apresentavam-se opacos ou ligeiramente transparentes, com aspecto homogéneo e ainda não apresentavam as margens transparentes.

No meio natural, as fêmeas das populações de *Daphnia*, parecem estar sincronizadas relativamente ao momento em que ocorre a passagem dos ovos para a câmara incubadora e ao estádio de desenvolvimento dos seus embriões (Green, 1956; Lei e Clifford, 1974). Desconhece-se, no entanto, se esta homogeneidade abrange todas as fêmeas de uma mesma população ou se há apenas tendência para a agregação, em determinada zona, das fêmeas que transportam embriões em estádio de desenvolvimento semelhante.

Apesar da manutenção dos organismos em cultura individual permitir o acompanhamento mais rigoroso das diferentes fases de desenvolvimento embrionário, foram utilizadas culturas de grupo pois, nestas condições, as fêmeas encontram-se mais sincronizadas em termos reprodutivos (observação pessoal) e, em termos práticos, o registo de observações fica muito facilitado.

De modo geral, as condições nutricionais deficientes influenciam negativamente a resistência e o desempenho reprodutivo durante os testes de toxicidade (Baird *et al.*, 1989b). Para além disso, Reinikainen *et al.* (1995a) referem a ocorrência de efeitos negativos mais

pronunciados na reprodução de *Daphnia* na presença de *Microcystis* tóxica, quando as fêmeas são submetidas a baixos níveis de alimento, antes e durante a exposição. Neste trabalho apenas se pretendeu avaliar o efeito da toxicidade de *M. aeruginosa*, e por isso, as condições nutricionais foram mantidas constantes antes e durante a exposição ao extracto tóxico, assim como na fase de acompanhamento até à libertação da quarta postura. Os organismos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e alimentação referidas anteriormente para o seu crescimento até à fase adulta.

O extracto de *M. aeruginosa* foi preparado segundo o referido na secção 2.1.4.3., tendo-se utilizado as seguintes concentrações de extracto: 0,25; 0,5 e 1 mg/ml para *D. pulex* e *D. pulicaria*; 0,5; 1, 2 e 4 mg/ml para *D. magna*. O meio M4 foi utilizado como meio de teste. Foram efectuadas 4 réplicas por controlo e por tratamento com 5 indivíduos de *D. magna* por 500 ml de solução teste e 5 indivíduos de *D. pulicaria* ou de *D. pulex* por 250 ml de solução teste.

A concentração de oxigénio dissolvido e os valores de pH nas soluções teste foram determinadas no início e fim da exposição e durante a fase seguinte até libertação da quarta postura. A concentração de microcistinas no meio foi quantificada através de ensaio ELISA de acordo com a metodologia descrita na secção 2.1.4.4. Foram efectuadas observações diárias em todos os indivíduos, tendo sido registado, para cada postura, o número de juvenis viáveis libertados e o número de ovos e embriões abortados em cada recipiente.

O período que os indivíduos passam na câmara incubadora pode não corresponder ao período embrionário, uma vez que os juvenis podem ser libertados antes que o desenvolvimento embrionário esteja completo (Lei e Clifford, 1974). Uma vez que em condições normais estes embriões sobrevivem e podem completar o seu desenvolvimento no meio de cultura, neste trabalho e para a primeira postura libertada não nos seria possível distinguir entre juvenis que completaram o seu desenvolvimento embrionário na câmara incubadora ou no meio de cultura, em contacto directo com o tóxico. Portanto, foram considerados e designados por "ovos abortados", os ovos cujo desenvolvimento foi interrompido nos estádios I a III de acordo com a classificação sugerida por Lei e Clifford (1974) para os estádios de desenvolvimento embrionário de *Daphnia schødleri in vitro*. Os embriões encontrados nos estádios IV a VIII da referida classificação, e os juvenis mortos com desenvolvimento embrionário completo foram considerados "embriões abortados".

2.3.3.2. Análise estatística

O critério indicativo de toxicidade foi a inibição da reprodução, avaliada através do número total de descendentes e da proporção de descendentes viáveis relativamente ao total de descendentes produzidos no final do teste e para cada uma das quatro posturas libertadas. Foi ainda avaliada a existência de diferenças entre as três espécies de *Daphnia* para a proporção de descendentes viáveis produzidos.

Os diferentes tratamentos foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) unifactorial. Os pressupostos da ANOVA foram testados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade e o teste de Bartlett para a homogeneidade de variâncias (Zar, 1996). Os dados relativos à proporção de produtos viáveis relativamente ao total produzido foram transformados utilizando a transformação arcoseno ($\text{arcsen}\sqrt{x}$) (Zar, 1996). Quando as diferenças se revelaram significativas ($p < 0,05$), foi utilizado o Teste de Tukey (Zar, 1996). Os valores de CENO (a mais elevada concentração testada que não produziu efeitos significativamente diferentes do grupo controlo) e de CEO (a mais baixa concentração testada que produziu uma resposta significativamente diferente do controlo) para o número total de descendentes produzidos e para a proporção de juvenis viáveis foram determinados utilizando a análise de variância (ANOVA) unifactorial e o teste de Tukey.

O valor de CE_{50} para a inibição da reprodução na primeira postura (número de descendentes inviáveis) foi calculado utilizando a análise "probit" (Finney, 1971).

2.3.4. Resultados

2.3.4.1. Oxigénio, pH e concentração de microcistinas

A concentração de oxigénio dissolvido medida nas soluções teste e controlo foi sempre superior a 7, 0 mg/l.

Os valores de pH nas soluções teste e controlo não variaram mais do que 1,5 unidades de pH, tendo oscilado entre um valor mínimo de 7,8 e um máximo de 8,2.

A concentração de microcistinas (µg MCYST/mg de células liofilizadas) e respectivo erro padrão determinada nas soluções base utilizadas para preparar os extractos usados nos testes foram: *D. pulex*: $0,63 \pm 0,04$; *D. pulicaria*: $0,64 \pm 0,07$; *D. magna*: $0,66 \pm 0,02$.

2.3.4.2. Inibição da reprodução no final do teste

O número total de organismos produzidos por *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* (juvenis viáveis e descendentes não viáveis incluindo ovos e embriões abortados e juvenis

mortos) no total das quatro posturas encontra-se representado na Figura 2.3.1. Nos tratamentos com extracto tóxico de *M. aeruginosa* o número total de descendentes produzidos durante o teste diferiu significativamente do grupo controlo (*D. pulex*: $F = 25,8$; g.l. = 3, 12; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 39,6$; g.l. = 3, 12; $p < 0,05$; *D. magna:* $F = 44,7$; g.l. = 4, 15; $p < 0,05$). Ocorreu, nas três espécies, uma diminuição do número total de descendentes produzidos com o aumento da concentração de extracto de *M. aeruginosa* (Tabela 2.3.1.). Apenas no teste com *D. magna*, e nas concentrações 0,5 e 1,0 mg/ml de extracto, os valores registados não diferiram significativamente do controlo (Tabela 2.3.1.).

Tabela 2.3.1. Teste de Tukey para o número total de descendentes produzidos durante o teste, para as três espécies estudadas. Os tratamentos unidos pela mesma linha horizontal não são significativamente diferentes. Os números representam as diferentes concentrações de extracto, ordenadas por ordem crescente dos valores médios.

Espécie	Resultados do teste de Tukey				
D. pulex	1	0,25	0,5	0	
D. pulicaria	1	0,5	0,25	0	
D. magna	4	2	1	0,5	0

Nas três espécies, a proporção de juvenis viáveis relativamente ao total de descendentes produzidos durante o teste nos tratamentos com extracto tóxico apresentou diferenças significativas relativamente ao controlo (*D. pulex*: $F = 237,6$; g.l. = 3, 12; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 87,4$; g.l. = 3, 12; $p < 0,05$; *D. magna:* $F = 87,4$; g.l. = 4, 15; $p < 0,05$) (Figura 2.3.1.; Tabela 2.3.2.). Com o aumento da concentração de extracto tóxico registou-se uma diminuição do número de juvenis viáveis produzidos (Tabela 2.3.2.).

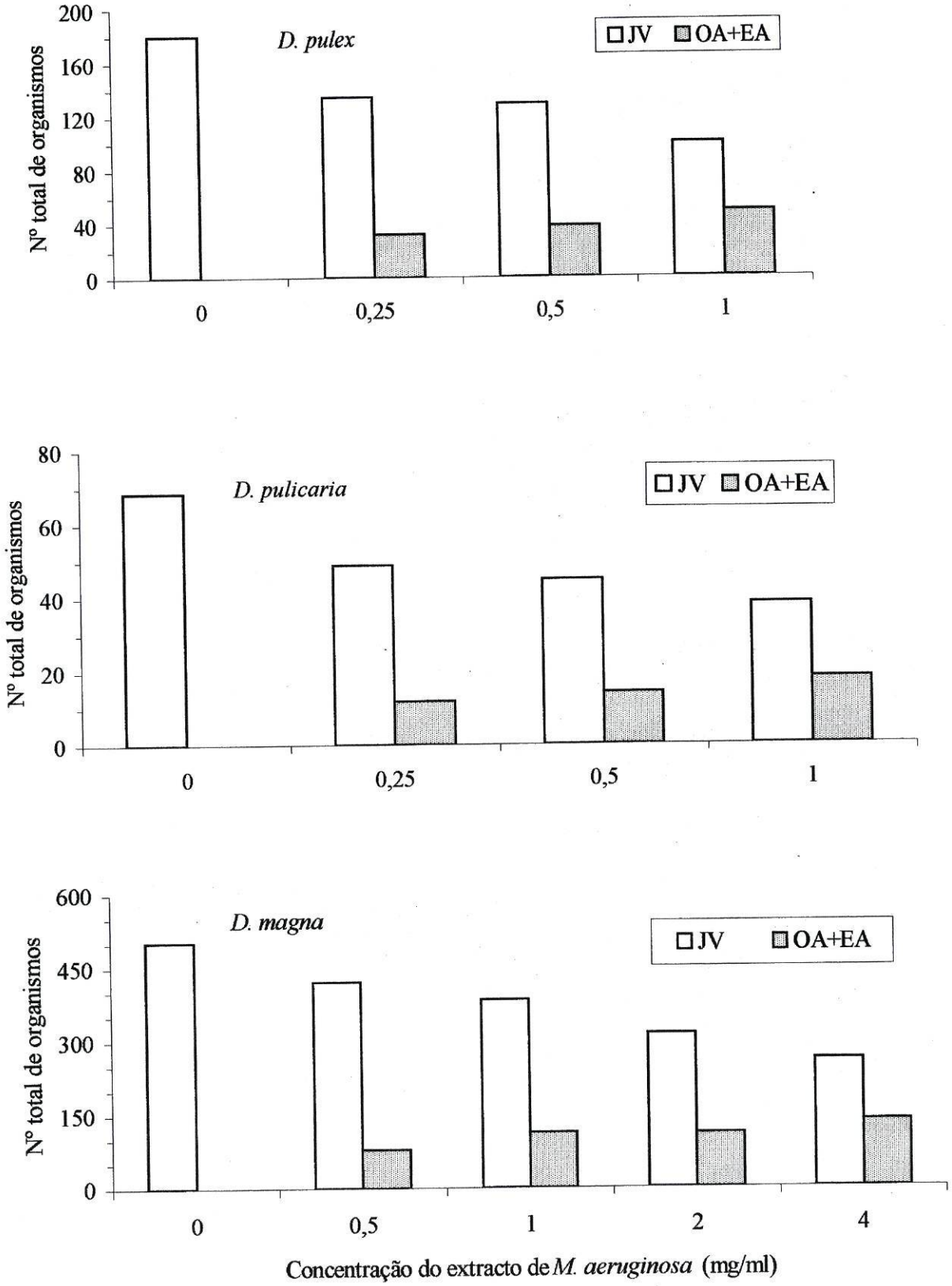


Figura 2.3.1. Número total de organismos produzidos durante o teste. JV - juvenis viáveis; OA+EA - Nº total de ovos e embriões abortados.

Tabela 2.3.2. Teste de Tukey para a proporção de juvenis viáveis relativamente ao total de descendentes produzidos para as três espécies estudadas. Os tratamentos unidos pela mesma linha horizontal não são significativamente diferentes. Os números representam as concentrações de extracto, ordenadas por ordem crescente dos valores médios.

Espécie	Resultados do teste de Tukey				
D. pulex	1	0,5	0,25	0	
D. pulicaria	1	0,5	0,25	0	
D. magna	4	2	1	0,5	0

Entre as três espécies, a proporção de juvenis viáveis relativamente ao total de descendentes produzidos não variou significativamente ($F = 0,08$; g.l .= 2,48; $p > 0,05$).

Os valores de CE_{50} e respectivos limites de confiança (lim. conf.) para as três espécies, calculados para o total do teste a partir do número de juvenis viáveis foram:

D. pulex: CE_{50}= 4,49 mg/ml; lim. conf. a 95%: 4,12 – 4,88

D. pulicaria: CE_{50}= 4,09 mg/ml; lim. conf. a 95%: 3,79 – 4,41

D. magna: CE_{50}= 16,59 mg/ml; lim. conf. a 95%: 15,73 – 17,50.

2.3.4.3. Inibição da reprodução em cada postura

O número de juvenis viáveis e de ovos e embriões abortados produzidos por *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* nas quatro posturas libertadas durante o teste nas diferentes concentrações de tóxico encontram-se representados nas Figuras 2.3.2., 2.3.3. e 2.3.4. Nos testes com as diferentes espécies de *Daphnia* não foram observadas diferenças significativas no número total de organismos produzidos na primeira e segunda posturas entre os vários tratamentos (Tabela 2.3.3.).

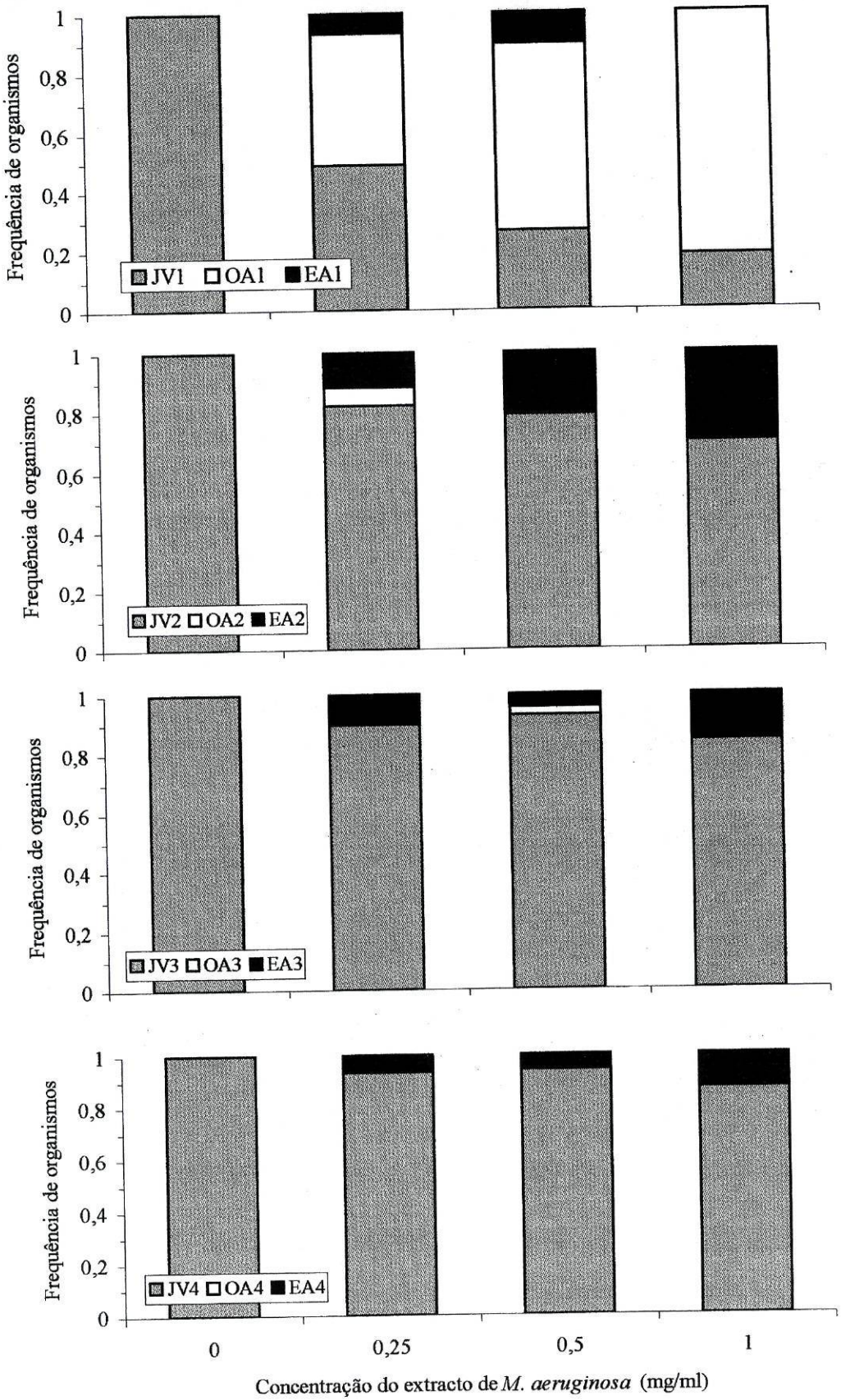


Figura 2.3.2. Frequência relativa do tipo de organismos produzidos por *D. pulex* nas quatro posturas após a exposição ao extracto tóxico de *M. aeruginosa*. JV- juvenis viáveis; OA- ovos abortados; EA- embriões abortados. 1, 2, 3, 4 – nº da postura.

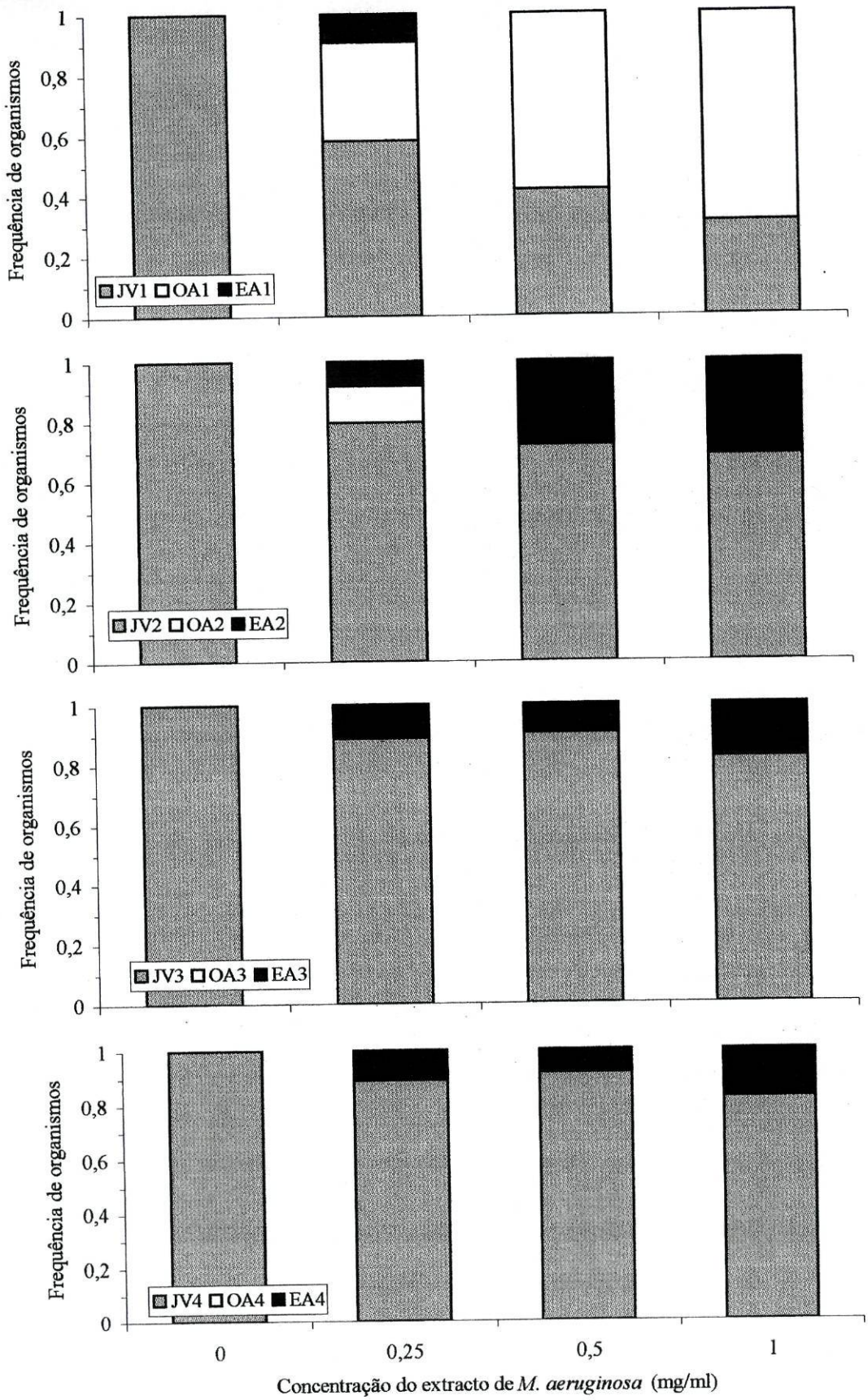


Figura 2.3.3. Frequência relativa do tipo de organismos produzidos por *D. pulicaria* nas quatro posturas após a exposição ao extracto tóxico de *M. aeruginosa*. JV - juvenis viáveis; OA - ovos abortados; EA - embriões abortados. 1, 2, 3, 4 – nº da postura.

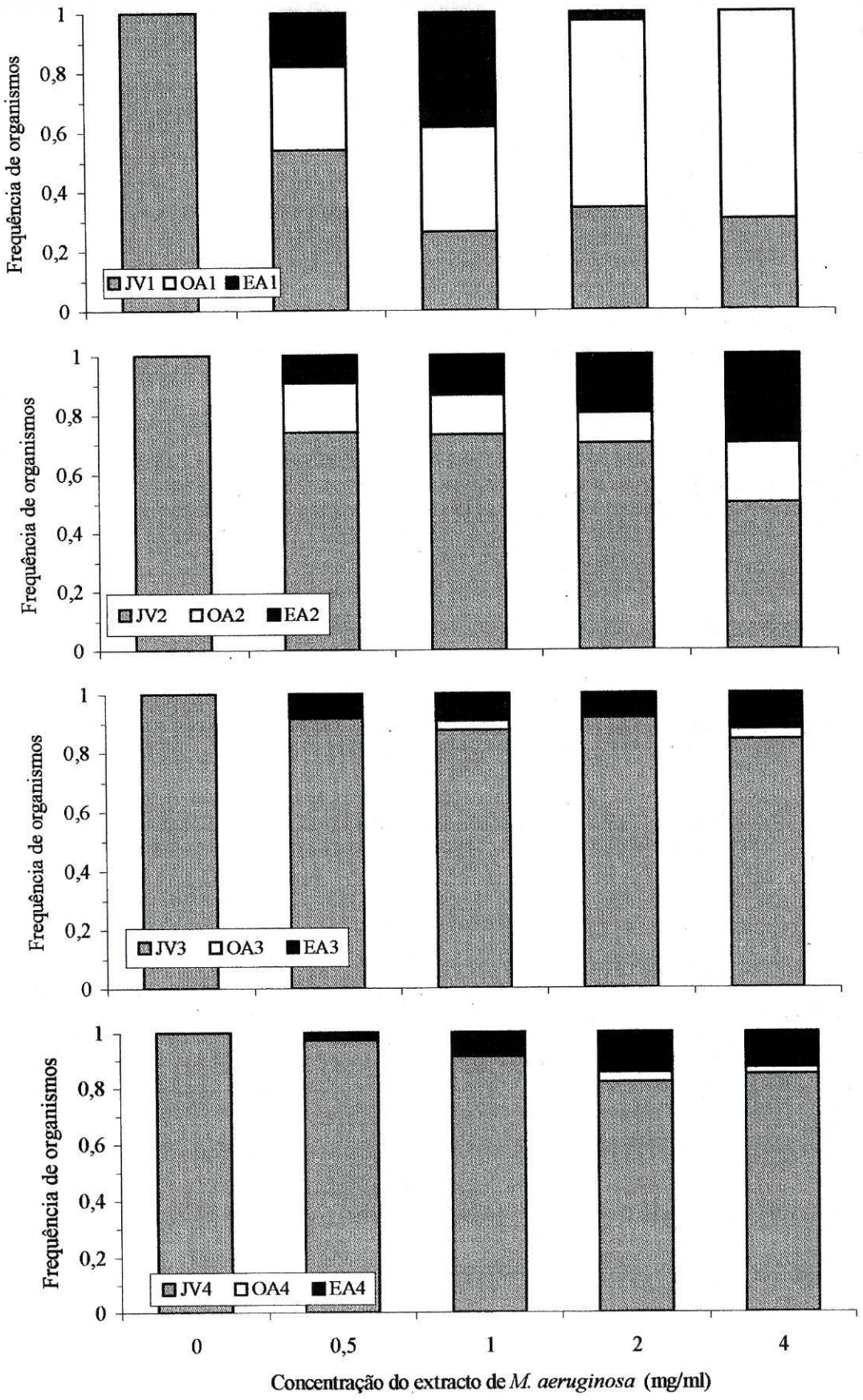


Figura 2.3.4. Frequência relativa do tipo de organismos produzidos por *D. magna* nas quatro posturas após a exposição ao extracto tóxico de *M. aeruginosa*. JV- juvenis viáveis; OA- ovos abortados; EA- embriões abortados. 1, 2, 3, 4 – nº da postura.

Tabela 2.3.3. ANOVA para o número total de organismos produzidos na primeira (P1) e segunda (P2) posturas pelas três espécies de *Daphnia*.

Espécie	postura	Resultados da ANOVA		
		F	g.l.	p
D. pulex	P1	3,24	3, 12	0,06
	P2	0,33	3, 12	0,81
D. pulicaria	P1	0,10	3, 12	0,95
	P2	0,97	3, 12	0,44
D. magna	P1	0,43	4, 15	0,79
	P2	0,19	4, 15	0,94

Na terceira e quarta posturas ocorreu uma diminuição significativa do número total de organismos produzidos entre os vários tratamentos (Tabelas 2.3.4. e 2.3.5.). Com o aumento da concentração de extracto tóxico verificou-se uma diminuição do número total de organismos produzidos (Tabela 2.3.5.). Em *D. pulex* e *D. pulicaria* os valores de CEO para o número total de organismos produzidos durante o teste foram mais elevados para a quarta do que para a terceira postura (Tabela 2.3.6.). Para *D. magna* o valor foi idêntico nas duas posturas (CEO = 2 mg/ml) (Tabela 2.3.6.). Para *D. pulex* e *D. pulicaria* os valores de CENO determinados para a terceira postura foram idênticos (< 0,25 mg/ml), enquanto os determinados para a quarta postura foram superiores em *D. pulex* (*D. pulex*: CENO = 0,5 mg/ml; *D. pulicaria*: CENO = 0,25 mg/ml). Para *D. magna* o valor de CENO foi superior ao registado para as outras duas espécies, tendo igual valor na terceira e quarta posturas (CENO=1 mg/ml).

Tabela 2.3.4. ANOVA para o número total de organismos produzidos nas terceira (P3) e quarta (P4) posturas.

Espécie	Postura	Resultados da ANOVA		
		F	g.l.	p
D. pulex	P3	54,9	3, 12	0
	P4	8,1	3, 12	0,003
D. pulicaria	P3	39,7	3, 12	0
	P4	13,2	3, 12	0
D. magna	P3	42,1	4, 15	0
	P4	39,0	4, 15	0

Tabela 2.3.5. Teste de Tukey para as diferenças no número total de organismos produzidos nas terceira (P3) e quarta (P4) posturas para as três espécies. Os tratamentos unidos pela mesma linha horizontal não são significativamente diferentes. Os números representam as diferentes concentrações de extracto, ordenadas por ordem crescente dos valores médios.

Espécie	Postura	Resultados do teste de Tukey				
D. pulex	P3	1	0,25	0,5	0	
	P4	1	0,25	0,5	0	
D. pulicaria	P3	1	0,25	0,5	0	
	P4	1	0,5	0,25	0	
D. magna	P3	4	2	1	0,5	0
	P4	4	2	0,5	0	1

Tabela 2.3.6. Valores de CEO e de CENO para o número total de organismos produzidos nas terceira (P3) e quarta posturas (P4).

	Valores de CEO (mg/ml)			Valores de CENO (mg/ml)		
postura	*D. pulex*	*D. pulicaria*	*D. magna*	*D. pulex*	*D. pulicaria*	*D. magna*
P3	0,25	0,25	2	< 0,25	< 0,25	1
P4	1,0	0,5	2	0,5	0,25	1

Nas três espécies registaram-se diferenças significativas na proporção de juvenis viáveis produzidos nas diferentes posturas (*D. pulex*: $F = 11,7$; g.l. = 3, 60; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 6,9$; g.l. = 3,60; $p < 0,05$; *D. magna*: $F = 14,5$; g.l. = 3, 76; $p < 0,05$) (Tabela 2.3.7.).

Tabela 2.3.7. Teste de Tukey para a proporção de juvenis viáveis produzidos durante o teste entre as quatro posturas. Os tratamentos unidos pela mesma linha horizontal não são significativamente diferentes. Os números representam as diferentes posturas, ordenadas por ordem crescente dos valores médios.

Espécie	Resultados do teste de Tukey			
D. pulex	1	2	3	4
D. pulicaria	1	2	3	4
D. magna	1	2	3	4

Os descendentes da primeira postura libertada foram os mais afectados, tendo a proporção de juvenis viáveis libertados nesta postura sido inferior ao registado nas posturas seguintes (Tabela 2.3.7.). Em todas as posturas, nos tratamentos com extracto ocorreu uma diminuição significativa na proporção de juvenis viáveis produzidos relativamente ao tratamento controlo (Tabela 2.3.8. e 2.3.9.).

De modo geral, com o aumento da concentração de extracto ocorreu uma diminuição do número de juvenis viáveis, embora nem sempre estatisticamente significativa (Tabela

2.3.9.). No teste com *D. magna* a proporção de juvenis viáveis produzidos no tratamento controlo na quarta postura, não diferiu significativamente do valor registado na mais baixa das concentrações de extracto tóxico (Tabela 2.3.9.). Os valores de CEO para a proporção de juvenis viáveis para cada uma das quatro posturas para *D. pulex* e *D. pulicaria* foram idênticos (CEO = 0,25 mg/ml). Para *D. magna* os valores de CEO calculados para a primeira, segunda e terceira posturas foram iguais (CEO = 0,5 mg/ml). Para a quarta postura obteve-se um valor superior (CEO = 1 mg/ml). Os valores de CENO foram iguais para *D. pulex* e *D. pulicaria* e para todas as posturas libertadas (CENO < 0,25 mg/ml). Para *D. magna*, para as primeira, segunda e terceira posturas, o CENO foi menor que 0,5 mg/ml e para a quarta postura apresentou um valor superior (CENO = 0,5 mg/ml).

Os resultados obtidos permitiram, ainda, o cálculo do valor de CL_{50} para os organismos abortados na primeira postura:

D. pulex: CL_{50} = 0,22 mg/ml; lim. conf. a 95%: 0,218 - 0,229

D. pulicaria: CL_{50} = 0,36 mg/ml; lim. conf. a 95%: 0,341 - 0,381

D. magna: CL_{50} = 0,32 mg/ml; lim. conf. a 95%: 0,286 - 0,357.

2.3.4.4. Avaliação qualitativa do tipo de descendentes inviáveis

Comparando o tipo de organismos abortados nas diferentes posturas verificou-se que na primeira postura, principalmente nas concentrações de extracto mais elevadas, os organismos inviáveis encontravam-se, principalmente, nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (estádio II e III) (Figuras 2.3.2., 2.3.3. e 2.3.4.). Para concentrações mais baixas de extracto, os organismos abortados atingiram um estádio de desenvolvimento mais avançado (embrião ou juvenil).

Na segunda postura (Figuras 2.3.2., 2.3.3. e 2.3.4.), para além da diminuição do número de descendentes inviáveis produzidos relativamente à primeira postura, os organismos abortados encontravam-se num estádio de desenvolvimento mais avançado (estádios IV a VIII; embrião ou juvenil).

Na terceira e quarta posturas ocorreu, igualmente, uma diminuição do número total de descendentes inviáveis, que eram principalmente embriões ou juvenis, sendo o número de organismos abortados no estádio de ovo muito reduzido.

A maioria dos indivíduos considerados dentro do grupo dos embriões abortados não atingiu a fase final do desenvolvimento embrionário (juvenil completamente formado).

Tabela 2.3.8. ANOVA para a proporção de juvenis viáveis produzidos nas quatro posturas (P1, P2, P3 e P4), nos vários tratamentos.

Espécie	Postura	Resultados da ANOVA		
		F	g.l.	p
D. pulex	P1	1185	3, 12	0
	P2	376,4	3, 12	0
	P3	46,5	3, 12	0
	P4	79,4	3, 12	0
D. pulicaria	P1	113,5	3, 12	0
	P2	68,1	3, 12	0
	P3	63,4	3, 12	0
	P4	56,9	3, 12	0
D. magna	P1	131,2	4, 15	0
	P2	117,8	4, 15	0
	P3	16,3	4, 15	0
	P4	15,2	4, 15	0

Tabela 2.3.9. Teste de Tukey para a proporção de juvenis viáveis produzidos em cada uma das quatro posturas. Os tratamentos unidos pela mesma linha horizontal não são significativamente diferentes. Os números representam concentrações de extracto ordenados por ordem crescente dos valores médios.

Espécie	Postura	Resultados do teste de Tukey
D. pulex	P1	1 0,5 0,25 0
	P2	1 0,5 0,25 0
	P3	1 0,25 0,5 0
	P4	1 0,25 0,5 0
D. pulicaria	P1	1 0,5 0,25 0
	P2	1 0,5 0,25 0
	P3	1 0,25 0,5 0
	P4	1 0,25 0,5 0
D. magna	P1	1 4 2 0,5 0
	P2	4 2 1 0,5 0
	P3	4 1 0,5 2 0
	P4	2 4 1 0,5 0

2.3.5. Discussão

2.3.5.1. Concentração de oxigénio e pH

Em *Daphnia*, a concentração de hemoglobina dos indivíduos que atingem a maturidade sofre alterações antes e após a passagem dos ovos para a câmara incubadora, devido à transferência de hemoglobina do adulto para os ovos (Kobayashi e Hoshi, 1984). Nestes organismos, a concentração de hemoglobina é influenciada pela concentração de oxigénio do meio e acompanha as suas variações (Fox e Phear, 1953; Carvalho, 1984). A concentração de hemoglobina na hemolinfa e o tempo de retenção do oxigénio são superiores em embriões precoces de *D. magna* do que nos adultos (Kobayashi e Takahashi, 1994), permitindo um melhor fornecimento de oxigénio aos embriões presentes na câmara incubadora, onde as concentrações de oxigénio são normalmente baixas (Paul e Pirow, 1997/98; Kobayashi e Takahashi, 1994). A reprodução e o crescimento de *D. magna* são alterados negativamente na presença de baixas concentrações de alimento e de oxigénio, apresentando os dois factores um efeito sinergístico (Hanazato, 1996). Uma vez que a câmara incubadora contacta directamente com o meio exterior, os embriões que aí se encontram em desenvolvimento estão sujeitos às flutuações de oxigénio que ocorrem no meio exterior e que podem perturbar o seu desenvolvimento. Os valores de oxigénio registados neste estudo foram sempre superiores a 7 mg/l. Atendendo a que uma concentração de oxigénio superior a 3 mg/l é o limite normalmente referido como suficiente, não é provável que a mortalidade registada nos organismos em desenvolvimento na câmara incubadora tenha sido consequência da falta de oxigénio do meio.

A viabilidade dos ovos de *Daphnia* é influenciada por alterações de pH (Vijverberg, 1996; Hamza *et al.*, 1998). A variação ocorrida nos valores de pH registados encontra-se dentro dos valores recomendados (igual ou inferior a 1,5 unidades de pH), não sendo, por isso, responsável pelas alterações observadas no desenvolvimento dos ovos.

2.3.5.2. Sobrevivência

Em vários estudos que avaliaram a toxicidade de *M. aeruginosa* para espécies de *Daphnia*, os principais efeitos negativos registados são a diminuição da sobrevivência e do crescimento, para além do atraso na maturação reprodutiva e do decréscimo na produção de descendentes (DeMott *et al.*, 1991; Hietala, 1996; Hietala *et al.*, 1995; 1997; Reinikainen *et al.*, 1994; 1995a; 1999; Repka, 1998).

Neste trabalho não foi registada mortalidade nos organismos adultos expostos ao

extracto tóxico, apesar de algumas das concentrações utilizadas estarem incluídas no intervalo de valores utilizado nos testes agudos, onde foram responsáveis por um decréscimo da sobrevivência (Capítulo 2.2.).

Nos testes agudos não foi fornecido qualquer tipo de alimento aos organismos durante o período de exposição ao tóxico. Nos ensaios aqui em discussão, foi fornecida a mesma quantidade de *C. vulgaris* utilizada para assegurar boas condições de crescimento e reprodução (Capítulo 2.1.). Provavelmente, por não estarem privados de alimento encontravam-se em melhores condições fisiológicas do que os indivíduos do teste agudo, apresentando–se, por isso, mais tolerantes ao tóxico. Estes resultados estão de acordo com os de Reinikainen *et al.* (1994), que ao avaliarem a toxicidade de várias concentrações de células de *M. aeruginosa* em *D. pulex* na presença de níveis crescentes de *Scenedesmus obtusiusculus* verificaram que uma determinada concentração de cianobactérias é letal na presença de baixa concentração de alimento, mas não produz qualquer efeito na sobrevivência quando a concentração de alimento é elevada. A longevidade, crescimento e reprodução de *Daphnia* são menos afectadas por *M. aeruginosa* quando se fornecem níveis altos de alimento de boa qualidade (Hietala *et al.* 1997). Os efeitos obtidos com as concentrações de extracto utilizadas não foram mais pronunciados provavelmente porque a quantidade de alimento distribuída diariamente foi suficiente para assegurar as necessidades dos indivíduos.

2.3.5.3. Reprodução

As cianobactérias são geralmente consideradas como alimento de baixa qualidade e a exposição a estirpes tóxicas resulta normalmente na redução do tamanho das posturas de *Daphnia* e de outros elementos do zooplâncton (Porter e Orcutt, 1980; Fulton e Paerl, 1987; Hanazato e Yasuno, 1987; Gilbert, 1990; Hietala *et al.*, 1995). Espécies de *Microcystis* aparentemente não tóxicas apresentam também baixo valor nutricional (Brett, 1993). Todavia, existem cianobactérias capazes de fornecer nutrientes suficientes ao normal crescimento e reprodução de *Daphnia,* mesmo na presença de grandes densidades de cianobactérias filamentosas, coloniais ou tóxicas (Benndorf e Henning, 1989; Fulton e Jones, 1991; Repka *et al.*, 1998),

Gastos energéticos resultantes de dificuldades na manipulação física do alimento e a inibição da filtração e alimentação, são aspectos que podem, também, interferir negativamente com a reprodução de *Daphnia* (Fulton e Paerl, 1987; De Mott *et al.*, 1991).

Nas três espécies testadas, o aumento da concentração de extracto tóxico provocou uma diminuição do número total de descendentes libertados assim como uma diminuição da

sua viabilidade (Figura 2.3.1.).

Uma vez que os cladóceros foram alimentados com *C. vulgaris*, a privação de alimento não deve ter sido o factor responsável pela diminuição do número de descendentes. Apesar de não ter sido quantificada a taxa de filtração, a ingestão de *C. vulgaris* não foi completamente inibida uma vez que se visualizou a presença de alimento no tubo digestivo e a remoção do alimento distribuído diariamente.

A utilização de toxinas dissolvidas nos testes com *Daphnia* e *Microcystis*, constitui uma forma de quantificar a sensibilidade fisiológica às toxinas e de a distinguir da interferência física com o processo de alimentação (DeMott *et al.* 1991). A utilização de um extracto aquoso de *M. aeruginosa* em lugar de células ou colónias intactas permitiu eliminar o efeito negativo da interferência mecânica com o aparelho filtrador durante a alimentação ou filtração.

De modo geral, nos testes com as três espécies de *Daphnia* e em todas as posturas consideradas, a reprodução dos organismos expostos ao extracto foi afectada, tendo-se verificado o aumento dos efeitos negativos com o aumento da concentração de extracto. Uma vez que o aspecto nutricional e a interferência mecânica foram eliminados como responsáveis pelos efeitos negativos observados, estes devem ser provocados pela toxicidade da estirpe de *M. aeruginosa* utilizada.

2.3.5.4. Efeitos na primeira postura

Nas três espécies de *Daphnia*, na primeira e segunda posturas não ocorreu uma diminuição do número total de ovos produzidos, contrariamente às posturas três e quatro onde se registou um decréscimo do número de descendentes produzidos nos tratamentos com extracto tóxico relativamente ao tratamento controlo (Tabela 2.3.3., 2.3.4. e 2.3.5.).

O número total de descendentes produzidos na primeira postura não foi alterado pelo contacto com o extracto, uma vez que a fêmea contactou com o tóxico depois dos ovos já estarem na câmara incubadora.

Os organismos libertados nas quatro posturas apresentaram diferenças de susceptibilidade ao tóxico, que podem ser consequência da diferente localização no corpo da fêmea e dos processos fisiológicos que estavam a ocorrer na altura da exposição ao extracto tóxico. Todas as posturas libertadas foram afectadas mas foi na primeira postura que surgiu uma maior percentagem de descendentes inviáveis (Figura 2.3.2., 2.3.3. e 2.3.4.; Tabela 2.3.7.). A primeira postura foi exposta ao tóxico enquanto ocorria o seu desenvolvimento embrionário na câmara incubadora, pelo que foi afectada directamente uma vez que o espaço

da câmara incubadora comunica directamente com o meio exterior (Baird *et al.*, 1991). O extracto tóxico, ao contactar com os ovos na câmara incubadora, provocou a interrupção imediata do seu desenvolvimento uma vez que os ovos abortados nesta postura se encontravam maioritariamente nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Muitos dos aspectos negativos de *M. aeruginosa* em *Daphnia* podem ser explicados se atendermos a limitações nutricionais (Reinikainen *et al.*, 1999), mesmo na presença de alimento com valor nutricional, dada a inibição da filtração ou os custos da metabolização das toxinas (Reinikainen *et al.*, 1999). No entanto, o efeito registado nos ovos da primeira postura não pode ser assim justificado. A interrupção do desenvolvimento dos ovos na câmara incubadora por toxinas de cianobactérias apenas recentemente foi referida (Reinikainen *et al.*, 1995; Barros *et al.*, 1998b; Nogueira, 1999) e os trabalhos efectuados avaliaram o efeito expondo a fêmea às cianobactérias durante mais do que um estádio, não permitindo associar o efeito do tóxico a um só estádio de desenvolvimento.

As microcistinas atingem principalmente os hepatócitos dos vertebrados através do sistema de transporte dos sais biliares (Weckesser e Martin, 1990) mas podem também causar alterações noutros tipos de células. As alterações registadas são semelhantes, no entanto, os hepatócitos necessitam de um tempo de exposição menor, o que pode ser devido a diferentes mecanismos de entrada das toxinas nas células (McDermott *et al.*, 1998). As microcistinas para além da hepatotoxicidade podem também perturbar a homeostasia iónica (Carbis *et al.*, 1996), tendo como consequência, alterações na permeabilidade das membranas (Forsteath, 1992). Os extractos contendo microcistinas causam danos no citoesqueleto e aumentam a permeabilidade dos hepatócitos e das células de ovário (CHO-K1), o que pode ser devido à presença de substâncias que apresentam reacção aditiva ou sinergística com as microcistinas (Fastner *et al.*, 1995).

Para além das microcistinas, existem nas cianobactérias outros compostos que são tóxicos para *Daphnia* (Jungmann, 1995; Reinikainen *et al.*, 1995b; Klapes, 1990; Jungmann *et al.*, 1991; Nizan *et al.*, 1986; Jungmann, 1992; Jungmann e Benndorf, 1994).

As toxinas presentes no extracto podem ter inviabilizado os ovos por alteração da permeabilidade das membranas, associada ou não a efeitos sinergísticos ou aditivos com outros compostos.

Durante o desenvolvimento embrionário dos ovos partenogenéticos de *Daphnia*, ocorre a perda das membranas que revestem o ovo externamente, estando este processo associado ao aumento de tamanho do embrião (Green, 1956; Lei e Clifford, 1974; Zaffagnini, 1987). Os organismos abortados na primeira postura encontravam-se principalmente nos estádios

iniciais (II e III) do desenvolvimento embrionário e apenas ocorreu desenvolvimento até um estádio mais adiantado nas concentrações de extracto tóxico mais baixas. A membrana externa que é a mais espessa, é libertada entre o estádio II e III (Lei e Clifford, 1974) e é provável que após a sua remoção, o ovo em desenvolvimento tenha ficado mais permeável às toxinas do meio, permitindo a sua entrada e consequente interrupção do desenvolvimento.

2.3.5.5. Efeitos na segunda postura

Em *D. magna* a distribuição de reservas nutritivas pelos ovos é um processo descontínuo, que ocorre apenas na primeira metade da fase de vitelogénese, que corresponde ao estádio que precede aquele em que a fêmea transporta os ovos na câmara incubadora (Bradley *et al.*, 1991). Neste estudo, não foi observada uma diminuição significativa no número de descendentes produzidos na segunda postura libertada, apesar de estes ovos se encontrarem na fase de vitelogénese quando a fêmea foi exposta ao tóxico (Figura 2.3.2., 2.3.3. e 2.3.4.; Tabela 2.3.3.). Bradley *et al.* (1991), ao estudarem os mecanismos de aprovisionamento dos ovos de *D. magna*, verificaram que os indivíduos mantidos em jejum a partir da oitava hora até ao final do estádio de vitelogénese sofreram redução significativa no tamanho da postura. Os indivíduos que foram sujeitos a jejum a partir das 16, 24 e 30 horas do estádio aprovisionaram mais ovos; os que apenas foram privados de alimento a partir da segunda metade do estádio produziram posturas completas (Bradley *et al.*, 1991). Neste trabalho, as fêmeas adultas entraram em contacto com o extracto num período até três horas após a passagem dos ovos para a câmara incubadora. Os ovos da segunda postura encontravam-se, então, no início da fase de vitelogénese. O tempo decorrido desde o início desta fase até à introdução das fêmeas no extracto tóxico, adicionado ao intervalo de tempo necessário para que o extracto tóxico produzisse efeito, deve ter sido suficiente para que a maioria dos ovos já tivesse recebido reservas nutritivas e, consequentemente, o número de ovos produzidos não fosse afectado.

Os organismos da segunda postura encontravam-se em processo de vitelogénese durante a exposição ao tóxico. Apesar dos resultados sugerirem que o processo fisiológico da fêmea que determina o número de ovos a produzir já teria sido ultrapassado ou não foi afectado, os ovos foram afectados negativamente nessa fase, pois verificou-se uma diminuição de viabilidade com o aumento da concentração de extracto (Figura 2.3.2., Tabela 2.3.9.).

No início da fase de vitelogénese desenvolvem-se, na superfície do oócito, numerosas microvilosidades e surgem, na região periférica do ooplasma, vesículas de pinocitose

(Zaffagnini, 1987). A intensa pinocitose que ocorre nesta fase permite que moléculas relativamente grandes, como hemoglobina e precursores das proteínas do vitelo, atravessem a parede do ovário e sejam incorporadas pelo oócito em crescimento (Zaffagnini, 1987). O processo de endocitose é também considerado uma via de entrada de vírus e toxinas nas células (Mata, 1992).

Surge, assim, a hipótese de as toxinas contidas no extracto terem atingido o corpo da fêmea através do tubo digestivo ou terem atingido directamente o ovário e terem entrado nos ovos por endocitose, simultaneamente com os percursores do vitelo, influenciando o seu desenvolvimento embrionário.

2.3.5.6. Efeitos na terceira e quarta posturas

Contrariamente ao que aconteceu nas duas primeiras posturas, onde não ocorreu uma diminuição significativa do número de descendentes produzidos, nas posturas três e quatro registou-se uma diminuição do número total de organismos produzidos com o aumento da concentração de extracto tóxico (Tabela 2.3.4. e 2.3.5.). A totalidade dos processos e factores que determinam e influenciam o tamanho das posturas em *Daphnia* e a sua qualidade não são conhecidos. A qualidade dos juvenis está fortemente associada ao investimento materno em vitelo e, por isso, relacionada com os recursos consumidos pela progenitora durante a vitelogénese (Brett, 1993).

Os ovos da terceira e quarta posturas encontravam-se em diferentes fases do desenvolvimento do oócito no ovário (Zaffagnini, 1987). A sua fase de vitelogénese só ocorreu depois da fêmea ter sido colocada em meio de cultura sem tóxico.

Uma vez que o extracto tóxico contactou com os ovos da terceira e quarta postura enquanto estes ainda estavam no ovário, surgem duas hipóteses:

A primeira, a de que os mecanismos fisiológicos da fêmea que determinam a quantidade e qualidade dos ovos a produzir ficaram afectados durante a exposição ao tóxico. A actividade das fosfatases proteicas 1 e 2A controla uma grande quantidade de processos celulares, entre os quais se destacam o metabolismo do glicogénio, síntese proteica e de ácidos gordos, glicólise e gluconeogénese (Cohen, 1989). A interferência directa dos tóxicos com a síntese, degradação e processos de transporte de lípidos, podem alterar os perfis lipídicos da hemolinfa. A deposição de lípidos nos ovos representa uma fonte de energia importante para o embrião em desenvolvimento. Qualquer interferência com o metabolismo dos lípidos do adulto pode influenciar directamente a sobrevivência dos descendentes (Giesy e Graney, 1989). As toxinas podem, ter interferido com o processo de formação e atribuição

de reservas da fêmea adulta ou dos ovos, originando a formação de ovos anormais, cujo desenvolvimento foi mais tarde interrompido.

A segunda hipótese é a de que as toxinas atingiram os ovos ainda no ovário. Toxinas de *M. aeruginosa* perturbam o crescimento e a maturação dos oócitos de ratos, provocando alterações degenerativas que têm como consequência um aumento da mortalidade dos embriões (Kirpenko *et al.*, 1981). A meiose dos oócitos de *Xenopus* é regulada pela fosfatase 1, pensando-se que esta enzima cataliza uma ou mais das reacções de desfosforilação que regulam a sua maturação (Ingebritsen e Cohen, 1983; Cohen, 1989). A MCYST-LR inibe a actividade das fosfatases proteicas 1 e 2A de *D. pulex* e *D. pulicaria* (DeMott e Dhawale, 1995). As toxinas presentes no extracto podem ter interferido com o processo de oogénese, originando ovos com deficiências que comprometeram o seu desenvolvimento embrionário. Para além do elevado número de processos celulares que as fosfatases 1 e 2A regulam e que podem interferir com a viabilidade dos descendentes de *Daphnia*, temos ainda que considerar a possibilidade da presença, para além das microcistinas, de outros compostos químicos tóxicos para *Daphnia*. Existe, ainda, a possibilidade de os ovos em desenvolvimento terem sido afectados pelos dois processos em simultâneo.

2.3.5.7. Diferenças entre as posturas

Nas três espécies de *Daphnia*, as quatro posturas apresentaram diferenças na proporção de juvenis viáveis produzidos. O número de descendentes viáveis aumentou da primeira para a quarta postura (Tabela 2.3.7.). Na primeira postura, o extracto tóxico provocou um efeito directo e imediato nos ovos, interrompendo o seu desenvolvimento. Nas posturas seguintes, para além do aumento do número de descendentes viáveis, o desenvolvimento embrionário processou-se até um estádio mais adiantado.

Os valores de CEO e de CENO (Tabela 2.3.6.) calculados para o número total de descendentes produzidos no teste com *D. pulex* e *D. pulicaria* foram mais elevados para a quarta postura comparativamente à terceira postura, evidenciando, também, a diminuição do efeito do extracto tóxico com o tempo. As concentrações testadas não permitiram detectar diferenças nos valores de CEO e de CENO relativamente ao número de juvenis viáveis produzidos nas quatro posturas, com excepção da quarta postura de *D. magna*, que apresentou um valor superior ao registado nas posturas anteriores. As concentrações testadas deviam ter incluído concentrações mais baixas, de forma a permitirem o cálculo mais rigoroso dos valores de CEO e de CENO. Existem várias hipóteses que podem explicar as diferenças obtidas entre as quatro posturas. Supondo que os efeitos registados durante as quatro posturas

foram devidos apenas à actuação das toxinas durante o período de exposição e que após a mudança dos organismos adultos para meio de cultura sem tóxico não actuaram mais, as diferenças encontradas entre a primeira postura e as posturas seguintes podem ser explicadas considerando que os ovos que se encontravam no espaço da câmara incubadora contactaram, rápida e directamente, com o extracto. Logo, foram mais afectados e numa fase mais precoce, enquanto os oócitos em desenvolvimento se encontravam mais protegidos no interior do corpo da fêmea (Zaffagnini, 1987). A exposição ao extracto tóxico pode ainda ter afectado negativamente a fêmea e as diferenças entre as posturas reflectirem a sua recuperação gradual ao longo do tempo. À semelhança de outros organismos (Eriksson *et al.*, 1986; 1989; Vasconcelos, 1995b; Prepas *et al.*, 1997) os cladóceros podem acumular toxinas (Watanabe, *et al.*, 1992) existindo evidências que suportam a sua transferência na cadeia trófica (Kotak *et al.*, 199?; Liras *et al.*, 1998). As toxinas presentes no extracto podem ter permanecido no corpo da fêmea e terem continuado a afectar os ovos após a substituição do meio de cultura, através de um ou mais processos.

O aumento gradual do número de juvenis viáveis produzidos nas quatro posturas pode, ainda, ser associado à recuperação das fêmeas por mecanismos de desintoxicação (Pflugmacher *et al.*, 1999), ou diminuição da quantidade de toxina presente devido à sua degradação (Jones e Orr, 1994; Cousins *et al.*, 1996; Bourne *et al.*, 1996; Welker e Steinberg, 1999).

2.3.5.8. Diferenças interespecíficas

De um modo geral, as três espécies de *Daphnia*, apresentaram uma resposta ao tóxico muito semelhante: redução do número total de descendentes produzidos a partir da terceira postura e diminuição do número de juvenis viáveis, com o aumento da concentração de extracto. As particularidades registadas em cada uma das posturas foram também idênticas. Apesar de as três espécies, no total do teste, não apresentarem diferenças relativamente à proporção de juvenis viáveis produzidos, para o mesmo efeito do extracto tóxico as concentrações utilizadas para *D. magna* foram mais elevadas do que as utilizadas no teste com as outras duas espécies. A reprodução de *D. magna* foi, por isso, menos sensível ao extracto de *M. aeruginosa* do que a das outras duas espécies.

Os valores de CE_{50}, calculados para as três espécies para o número de juvenis viáveis produzidos no final do teste, colocam *D. pulicaria* como a espécie mais sensível (CE_{50} = 4,09 mg/ml) e *D. magna* como a mais resistente (CE_{50} = 16,6 mg/ml), apresentando-se *D. pulex* com sensibilidade intermédia (CE_{50} = 4,49 mg/ml).

Os valores de CEO e de CENO (Tabela 2.4.6.) calculados para o número total de descendentes produzidos nas posturas três e quatro e para a proporção de descendentes viáveis produzidos nas diferentes posturas, são também superiores em *D. magna* .Os valores de CEO e de CENO são calculados com base nas concentrações utilizadas nos testes e estão, por isso, dependentes do intervalo de concentrações adoptadas, podendo fazer com que ensaios realizados em idênticas condições mas utilizando diferentes concentrações originem valores de CEO e de CENO diferentes (OECD, 1993). Apesar desta limitação, os resultados obtidos parecem indicar *D. magna* como a espécie mais resistente.

Num estudo com *Daphnia* para avaliação da existência de diferenças intra e interespecíficas, *D. pulex*, foi a espécie mais sensível e *D. longispina* a mais tolerante enquanto *D. magna* apresentou sensibilidade intermédia a *M. aeruginosa* (Reinikainen *et al.*, 1998).

Os valores de CL_{50} encontrados para as três espécies, para a primeira postura, não são, no entanto, muito diferentes, o que sugere que, numa fase inicial do desenvolvimento, a constituição dos ovos exibe pouca diferenciação sendo, por isso, os ovos das três espécies afectados de forma semelhante. Os valores de CL_{50} encontrados para o teste agudo com os ovos no exterior da fêmea (Capítulo 2.2.) apresentam idêntica relação. Nas posturas seguintes, a inviabilização dos descendentes já terá sido também influenciada pela diferente estrutura física e fisiológica da fêmea, tendo as diferenças entre as três espécies sido realçadas.

2.4. Toxicidade de *M. aeruginosa* durante o período juvenil de *Daphnia*

2.4.1. Introdução

A duração do ciclo de vida dos cladóceros desde a libertação do ovo na câmara de incubação até à morte do adulto é muito variável, dependendo das espécies e das condições ambientais (Wetzel, 1993). Geralmente, a sua duração aumenta com o decréscimo da temperatura, devido à menor actividade metabólica dos organismos. No ciclo de vida de *Daphnia* podem considerar-se quatro períodos diferentes: ovo, juvenil, adolescente e adulto (Green, 1956; Cooney, 1995). O ovo desenvolve-se e eclode na câmara de incubação, originando juvenis, morfologicamente idênticos aos adultos mas de menores dimensões, e que são libertados ao fim de aproximadamente dois dias, pouco tempo antes da fêmea mudar o exoesqueleto. *D. magna* e *D. pulex* geralmente atingem a maturidade em seis a dez dias e têm três a cinco estádios de juvenil (Soares, 1989; Cooney, 1995). A fase juvenil dos cladóceros corresponde ao período iniciado com a sua libertação da câmara de incubação para o meio exterior e termina quando ocorre a passagem dos ovos da primeira postura para a câmara de incubação. O último dos estádios pré-adultos, em que ocorre o desenvolvimento completo da primeira postura de ovos no ovário, é considerado como estádio adolescente (Green, 1956). A fase adulta corresponde ao período de tempo desde o aparecimento da primeira postura de ovos na câmara de incubação até a morte do indivíduo. Durante esta fase ocorre a libertação, a intervalos de tempo regulares, de várias posturas. Com o envelhecimento das fêmeas ocorre

normalmente o aumento do intervalo de tempo entre as posturas. O intervalo entre as posturas para *D. magna*, a 20°C, é normalmente de três dias, mas com o aumento da idade pode atingir quatro a cinco dias (Soares, 1989).

A perda do exoesqueleto, que ocorre durante toda a vida dos Crustáceos, é um processo contínuo que está intimamente associado ao crescimento dos indivíduos e que é normalmente utilizado para a divisão do seu ciclo de vida em estádios (período inter-mudas). Durante a fase juvenil ocorrem normalmente quatro a seis mudas, a primeira das quais ocorre quando os juvenis têm mais do que 24 horas de idade (Green, 1956; Soares, 1989). A fase de adolescente consiste num só estádio que termina quando os ovos são depositados na câmara de incubação poucos minutos após a muda. No fim de cada estádio da fase adulta, associado com o processo de muda ocorre tipicamente a libertação dos juvenis que se desenvolveram na câmara de incubação, a libertação propriamente dita do exoesqueleto, e a deposição dos ovos da postura seguinte na câmara de incubação.

Durante o processo de muda dos Crustáceos, podem distinguir-se quatro fases: a fase preparatória, pró-ecdísia (do inglês proecdysis) ou pré-muda, a ecdísia (ecdysis) ou muda propriamente dita, a pós-ecdísia (postecdysis) ou pós-muda e a fase intermudas (Ruppert e Barnes, 1994). Durante a fase preparatória ocorre geralmente a reabsorção de cálcio da cutícula do exoesqueleto sendo as camadas membranosas e parte das camadas calcificadas do velho exoesqueleto reabsorvidas pela epiderme. Após a separação entre a cutícula e a epiderme, o organismo fica preparado para o rápido processo de muda. O corpo aumenta de volume devido à entrada de água, provavelmente provocada por diferenças de pressão osmótica, e ocorre a separação do exoesqueleto. Durante a pós-muda, é secretada a cutícula e ocorre a sua calcificação e endurecimento à volta do corpo. Posteriormente, o excesso de água é removido e o corpo fica alojado dentro de um exoesqueleto maior que o anterior. O acréscimo de espaço livre entre o corpo e o exoesqueleto permite o crescimento dos tecidos do corpo durante a fase intermudas (Ruppert e Barnes, 1994).

Devido à constituição rígida do exoesqueleto de *Daphnia*, o crescimento resulta da multiplicação das células da epiderme nos momentos que sucedem a libertação da muda. No período compreendido entre duas mudas, as células epidérmicas completam apenas um ciclo celular, permanecendo a maior parte do tempo na fase G1 (Beaton e Hebert, 1994). A fase S do ciclo celular ocorre logo após a muda, ao que se segue uma fase de intensa actividade mitótica, o que faz com que o período de divisão celular fique restrito a um pequeno período de tempo após a libertação do exoesqueleto (Beaton e Hebert, 1994). Durante o ciclo celular das células eucarióticas ocorrem ainda outros processos, nomeadamente a síntese de RNA e

de proteínas para a mitose (fase G2), a síntese de histonas durante o período S, e a sua fosforilação (especialmente da H1) durante a condensação da cromatina (De Robertis e De Robertis, Jr., 1987).

As fosfatases de serina e treonina (tipo 1 e 2A) estão presentes em todos os tipos de células eucarióticas e participam no controlo de um grande número de processos celulares, entre os quais se salienta o ciclo celular, a proliferação celular, a síntese proteiça, a regulação da transcrição e a neurotransmissão (Cohen, 1989). São ainda capazes de influenciar a actividade das nucleoproteínas nomeadamente das histonas H1 e H2B (Ingebritsen e Cohen, 1983). As microcistinas, são capazes de inibir a actividade das fosfatases proteicas do tipo 1 e 2A de *Daphnia* (DeMott e Dhawale, 1995).

Durante a fase juvenil de *Daphnia*, isto é, desde que os organismos são libertados da câmara de incubação da progenitora até que surge a primeira postura de ovos na sua câmara de incubação, ocorrem vários fenómenos, entre os quais se salienta o crescimento e a preparação para a reprodução. Nas diferentes etapas, os organismos apresentam diferenças fisiológicas que provavelmente serão responsáveis por diferentes sensibilidades aos tóxicos, existindo ainda a possibilidade de estes interferirem apenas com alguns desses processos.

2.4.2. Objectivo

O objectivo deste trabalho foi avaliar a existência de alterações na sensibilidade de *Daphnia* à toxicidade de *M. aeruginosa*, durante os vários estádios da fase juvenil.

2.4.3. Material e Métodos

2.4.3.1. Procedimentos gerais

Juvenis de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* libertados há menos de 12 horas da câmara de incubação de fêmeas mantidas em cultura individual, foram expostos por períodos de vinte e quatro horas a um extracto de *M. aeruginosa*, até que as fêmeas do tratamento controlo atingissem o fim da fase juvenil. Neste trabalho, a fase juvenil foi considerada como o intervalo de tempo iniciado com a saída dos organismos da câmara de incubação da progenitora e terminado com o aparecimento na câmara de incubação dos juvenis, dos ovos da primeira postura. O último dos estádios antes da fase adulta (denominado fase adolescente (Green, 1956)), não foi exposto ao extracto, uma vez que a sua sensibilidade já foi abordada

no capítulo 2.3. Os Crustáceos apresentam crescimento descontínuo devido à existência de um exoesqueleto e, durante esta fase, ocorre normalmente em *Daphnia* a libertação de várias mudas que antecedem períodos de crescimento dos indivíduos. A libertação das mudas é normalmente utilizada para fazer a divisão da fase juvenil em estádios. Neste trabalho optou-se, no entanto, por fazer a divisão da fase juvenil em períodos de vinte e quatro horas, de modo a controlar de forma mais rigorosa o tempo de exposição ao extracto, uma vez que os organismos utilizados nos testes nem sempre estavam sincronizados quanto ao momento de libertação da muda. Para cada um dos estádios em que foi divida a fase juvenil, um grupo de dez juvenis, em cultura individual foi exposto ao extracto tóxico. Posteriormente, o grupo foi transferido para meio de cultura novo e sem extracto e acompanhado até à libertação da primeira postura de ovos para o exterior. Adicionalmente ao controlo foram considerados seis tratamentos para *D. pulex* e *D. magna* e quatro para *D. pulicaria*. O extracto de *M. aeruginosa* (IZANCYA 2) foi preparado conforme descrito na secção 2.1.4.3. As concentrações de extracto utilizadas, 0,5 mg/ml para *D. pulex* e *D. pulicaria* e 4 mg/ml para *D. magna*, são semelhantes aos valores de CL_{50} às 48 horas para os indivíduos juvenis, obtidos neste trabalho e que se encontram descritos no Capítulo 2.2. A preparação dos extractos, assim como o método utilizado para a determinação da concentração de microcistinas presentes na solução base usada, encontra-se descrita nas secções 2.1.4.3. e 2.1.4.4. As condições ambientais e de alimentação utilizadas para o grupo controlo e para os organismos dos vários tratamentos, antes, durante e após a exposição ao extracto foram idênticas às referidas na secção 2.1.3. para a cultura individual dos organismos. Os valores de oxigénio dissolvido no meio (mg/l) e de pH foram determinados no início e no fim do período de exposição ao extracto tóxico. Os indivíduos dos vários tratamentos foram observados diariamente, tendo sido registada a sobrevivência, a presença de ovos na câmara de incubação, o número de juvenis libertados e a sua viabilidade. Para a determinação do comprimento do corpo foi recolhida a muda libertada pela fêmea, após a libertação da primeira postura.

2.4.3.2. Determinação do comprimento do corpo dos cladóceros

O crescimento dos cladóceros é um fenómeno descontínuo e cíclico, ocorrendo logo após a libertação da muda, enquanto a nova cutícula ainda não endureceu (Boué e Chanton, 1962). No exoesqueleto libertado na altura da muda, o comprimento do primeiro exopódito da segunda antena constitui um bom indicador do comprimento do corpo dos animais na fase que precede a muda (Soares, 1989; Barros, 1994). Este método indirecto, para além de reduzir o "stress" provocado no animal durante os testes devido ao seu manuseamento, facilita a

determinação do comprimento do corpo, em termos práticos, pois permite que as carapaças sejam congeladas e medidas posteriormente. Neste trabalho, avaliou-se a existência de relação entre o tamanho do primeiro exopódito da segunda antena e o tamanho do corpo para *D. pulex* e *D. pulicaria*. Foi determinado o comprimento do corpo de indivíduos de diferentes tamanhos, aguardou-se a libertação da muda seguinte e mediu-se o comprimento do primeiro exopódito da segunda antena. Utilizando as equações resultantes da análise de regressão linear entre as medições efectuadas na carapaça ($C_{exopódito}$) libertada na muda e o comprimento do corpo medido no organismo (C_{corpo}), determinou-se o comprimento do corpo dos organismos.

As equações de regressão obtidas e os valores de r^2 foram:

D. pulex $C_{corpo} = 0,071 + 6,84 \times C_{exopódito}$ $(r^2 = 0,87)$

D. pulicaria $C_{corpo} = 0,047 + 7,45 \times C_{exopódito}$ $(r^2 = 0,96)$.

Estas equações foram utilizadas para determinação do comprimento do corpo dos organismos a partir das medições efectuadas no exopódito da muda libertada pelas fêmeas após a primeira postura. Para *D. magna* utilizou-se a equação determinada pelo mesmo método e para o mesmo clone por Soares (1989) $C_{corpo} = - 0,48 + 10,90 \times C_{exopódito}$ $(r^2 = 0,99)$

2.4.3.3. Análise estatística

A influência do extracto de *M. aeruginosa* durante a fase juvenil de *Daphnia* foi avaliada através do estudo da mortalidade dos juvenis nos vários tratamentos, da duração da fase juvenil e do crescimento, quantificado através do tamanho da fêmea na primeira postura. Foram ainda determinados os efeitos na reprodução através do número total de juvenis e do número de juvenis viáveis produzidos por fêmea na primeira postura. Os efeitos do extracto tóxico na mortalidade dos juvenis foram avaliados usando o Teste Exacto de Fisher (EPA, 1989). A existência de diferenças significativas entre os vários tratamentos para os outros parâmetros estudados foi avaliada através da análise de variância unifactorial. Quando surgiram diferenças significativas foi utilizado o Teste de Tukey. Os pressupostos da ANOVA foram testados utilizando o teste de Kolmogorov - Smirnov para a normalidade e o teste de Bartlett para a homogeneidade de variâncias (Zar, 1996).

2.4.4. Resultados

2.4.4.1. Oxigénio, pH e concentração de microcistinas

Os valores mínimos de oxigénio dissolvido no meio determinados no início e no fim da exposição foram respectivamente 8,52 mg/l e 7,50 mg/l. Os valores de pH no início do período de exposição oscilaram entre 7,69 e 7, 90 e entre 7,47 e 7, 82 no fim da exposição.

A concentração de microcistinas, e o respectivo erro padrão, determinada na solução de reserva usada na preparação dos extractos utilizados no teste com *D. pulex, D. pulicaria* e *D. magna* foi respectivamente 0,422 ± 0,04, 0,434 ± 0,05 e 0,468 ± 0,04 µg MCYST/mg de células liofilizadas.

2.4.4.2. Sobrevivência

A sobrevivência dos indivíduos expostos ao extracto tóxico nos diferentes períodos de 24 horas da sua fase juvenil encontra-se representada na Figura 2.4.1. Nas três espécies, não ocorreu mortalidade nos indivíduos do tratamento controlo. A maior redução na sobrevivência ocorreu entre os indivíduos expostos ao tóxico nos primeiros dias da sua fase juvenil. Para as três espécies apenas a sobrevivência registada nos tratamentos dos dias 1 e 2 diferiu significativamente da registada no tratamento controlo (Tabela 2.4.1.).

Tabela 2.4.1. Resultados do Teste Exacto de Fisher para a sobrevivência das espécies de *Daphnia* nos dias 1 e 2 de exposição.

	Dia	A	B	a	b	P
D. pulex	1	10	10	10	4	0,043
	2	10	10	10	3	0,043
D. pulicaria	1	10	10	10	6	0,043
	2	10	10	10	4	0,043
D. magna	1	10	10	10	6	0,043
	2	10	10	10	6	0,043

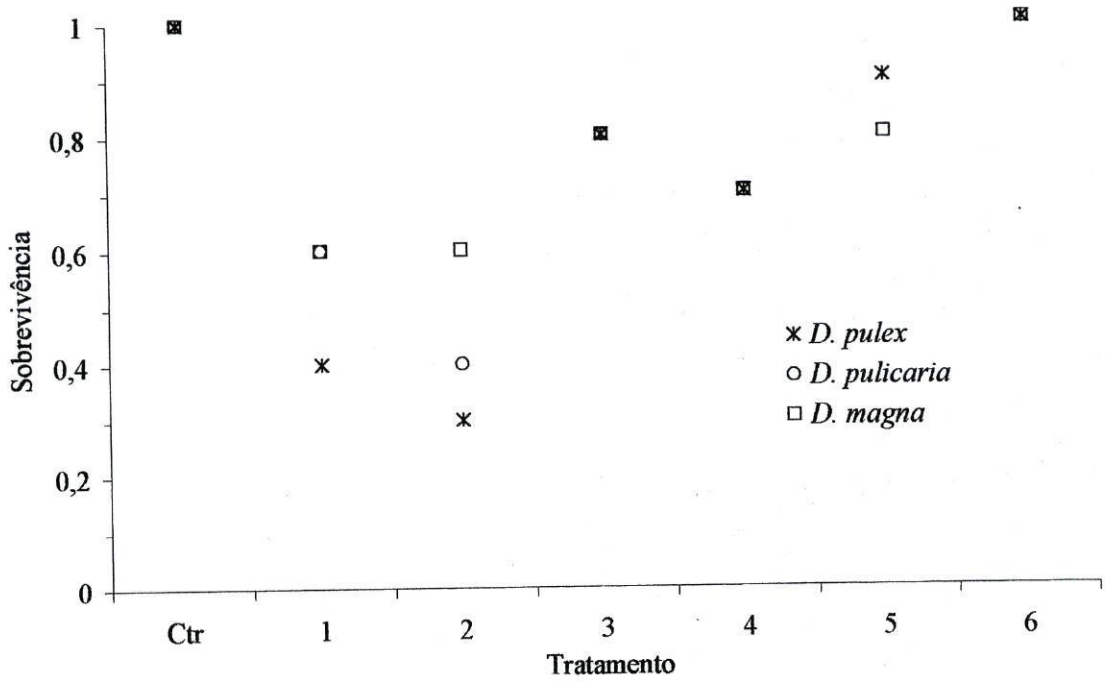


Figura 2.4.1. Sobrevivência de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* no final do teste, após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Ctr- tratamento controlo; 1 a 6- dia de exposição ao tóxico.

2.4.4.3. Reprodução

Foram detectadas diferenças significativas na idade da fêmea na primeira postura, entre os indivíduos expostos ao extracto nos diferentes períodos da fase juvenil (*D. pulex*: $F = 50,7$; g.l. = 6, 44; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 4,56$; g.l. = 4, 30; $p < 0,05$; *D. magna*: $F = 5,75$; g.l. = 6, 48; $p < 0,05$). Todos os indivíduos expostos ao extracto tóxico sofreram atraso na libertação da primeira postura, relativamente ao tratamento controlo (Figura 2.4.2.). Os indivíduos de *D. pulex* e *D. magna* expostos nos dias 5 e 6 ao extracto e os de *D. pulicaria* expostos nos dias 3 e 4 não apresentaram atraso na libertação da primeira postura significativamente diferente da registada no tratamento controlo (Figura 2.4.2.).

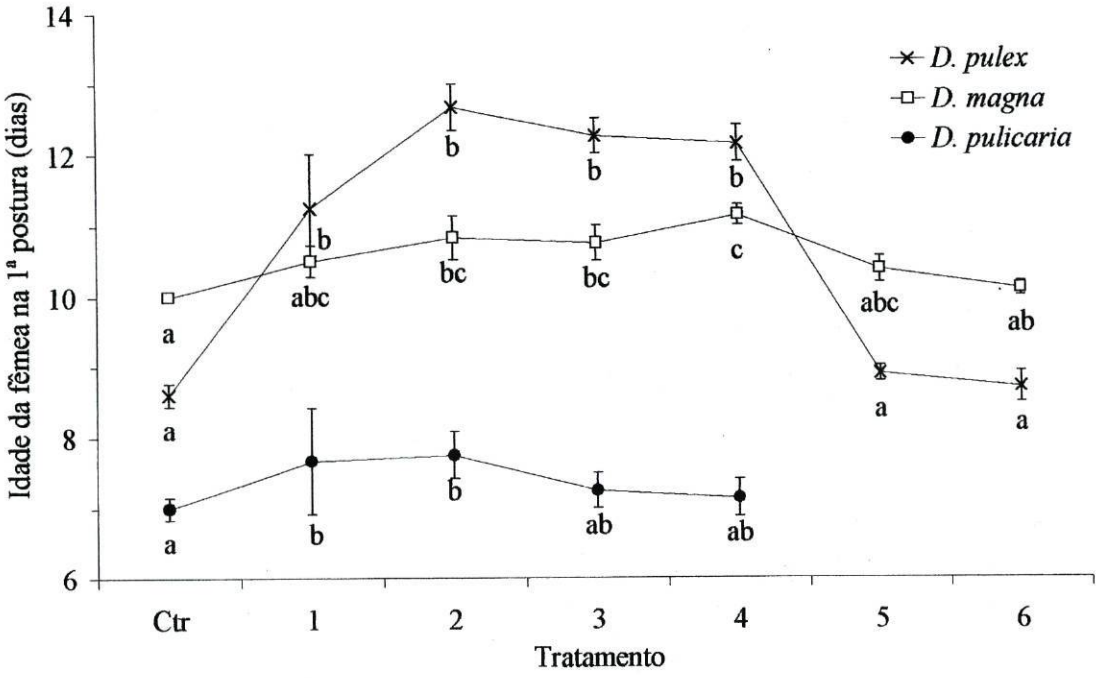


Figura 2.4.2. Idade da fêmea na libertação da primeira postura (dias), após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Os valores apresentados correspondem à média das idades das fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. Ctr - tratamento controlo; 1 a 6 - dia de exposição ao tóxico.

Foram detectadas diferenças significativas nas dimensões do corpo da fêmea na primeira postura, entre os indivíduos expostos ao extracto nos diferentes períodos da fase juvenil (*D. pulex*: $F = 73,4$; g.l. = 6, 44; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 81,6$; g.l. = 4, 30; $p < 0,05$; *D. magna*: $F = 19,4$; g.l. =6, 48; $p < 0,05$). Todos os indivíduos expostos ao extracto tóxico sofreram redução no tamanho do corpo, relativamente ao registado para o tratamento controlo, com excepção dos indivíduos de *D. pulicaria* que foram expostos no dia 4 e dos indivíduos de *D. pulex* que foram expostos no dia 6 (Figura 2.4.3.). Os indivíduos de *D. pulex* e *D. magna* expostos nos dias 5 e 6 ao extracto e os de *D. pulicaria* expostos no dia 4 não apresentaram redução do tamanho do corpo, medido na libertação da primeira postura significativamente diferente da registada no tratamento controlo (Figura 2.4.3.). Todos os indivíduos de *D. magna* expostos ao extracto apresentaram tamanho significativamente diferente do registado no tratamento controlo.

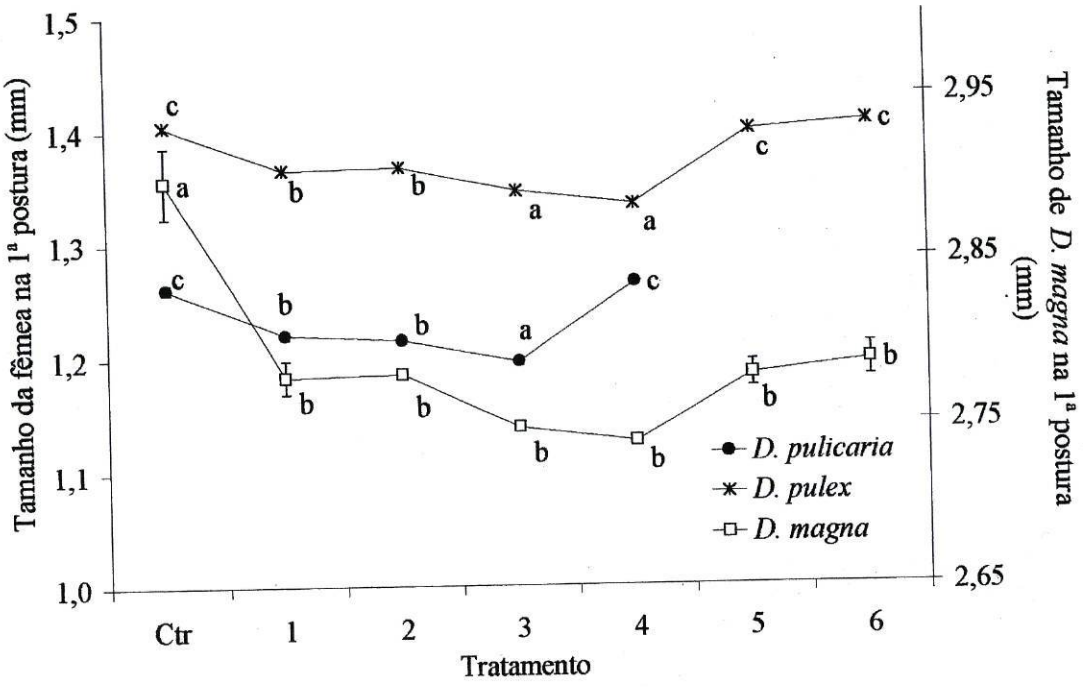


Figura 2.4.3. Tamanho da fêmea na libertação da primeira postura (mm), após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Os valores apresentados correspondem à média dos tamanhos das fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. Ctr - tratamento controlo; 1 a 6 - dia de exposição ao tóxico.

Foram detectadas diferenças significativas no número total de juvenis e no número de juvenis viáveis libertados da fêmea na primeira postura, entre os indivíduos expostos ao extracto nos diferentes períodos da fase juvenil (Tabela 2.4.2.).

Tabela 2.4.2. Resultados da ANOVA para o número total de juvenis e para o número de juvenis viáveis libertados na primeira postura pelas três espécies de *Daphnia*.

		Valores de F	g.l.	Probabilidade
D. pulex	Nº total juvenis	3,13	6, 44	0,012
	Nº juvenis viáveis	4,13	6, 44	0,002
D. pulicaria	Nº total juvenis	2,69	4, 30	0,049
	Nº juvenis viáveis	8,87	4, 30	0
D. magna	Nº total juvenis	4,72	6, 48	0,001
	Nº juvenis viáveis	21,01	6, 48	0

Todos os indivíduos expostos ao extracto tóxico apresentaram redução do número total de juvenis libertados na primeira postura, relativamente ao tratamento controlo (Figura 2.4.4.). Os indivíduos de *D. pulex* expostos ao extracto nos dias 5 e 6, os de *D. pulicaria* expostos nos dias 3 e os de *D. magna* expostos nos dias 4 e 5 apresentaram um número total de juvenis na primeira postura significativamente diferente do registado no tratamento controlo (Figuras 2.4.4., 2.4.5. e 2.4.6.).

Os indivíduos expostos ao extracto tóxico no fim do período juvenil apresentaram redução do número de juvenis viáveis libertados na primeira postura, relativamente ao tratamento controlo. Os indivíduos de *D. pulex* expostos ao extracto nos dias 5 e 6, os de *D. pulicaria* expostos nos dias 3 e 4 e os de *D. magna* expostos nos dias 4, 5 e 6 apresentaram um número de juvenis viáveis na primeira postura significativamente diferente do registado no tratamento controlo (Figuras 2.4.4., 2.4.5. e 2.4.6.).

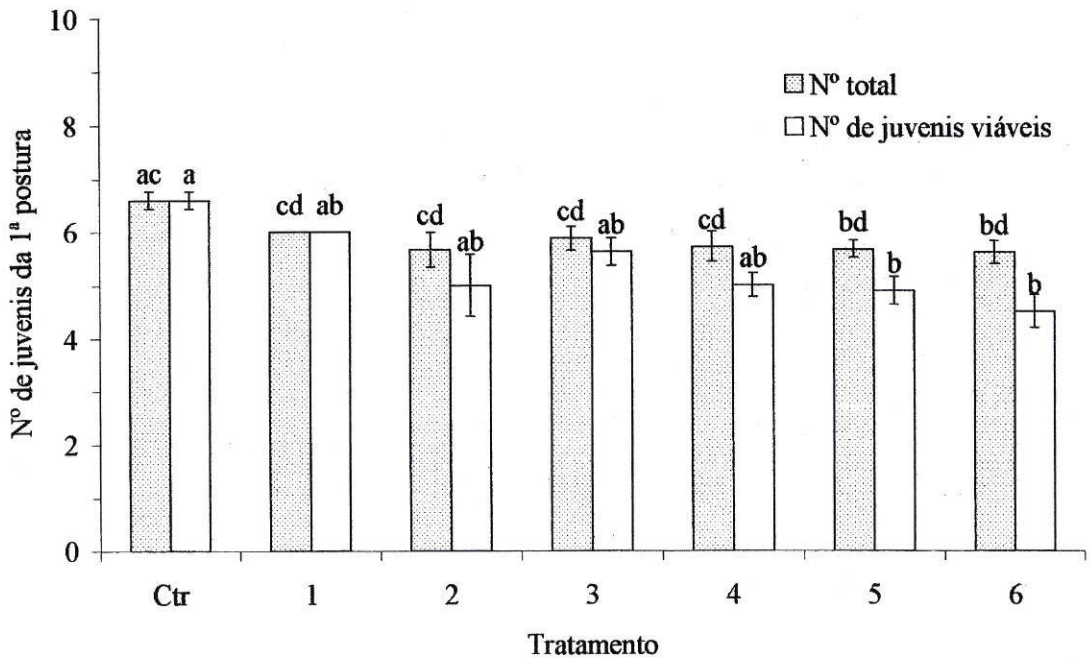


Figura 2.4.4. Número total de juvenis e número de juvenis viáveis libertados na primeira postura por *D. pulex*, após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Os valores apresentados correspondem à média dos juvenis produzidos pelas fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. Ctr - tratamento controlo; 1 a 6 - dia de exposição ao tóxico.

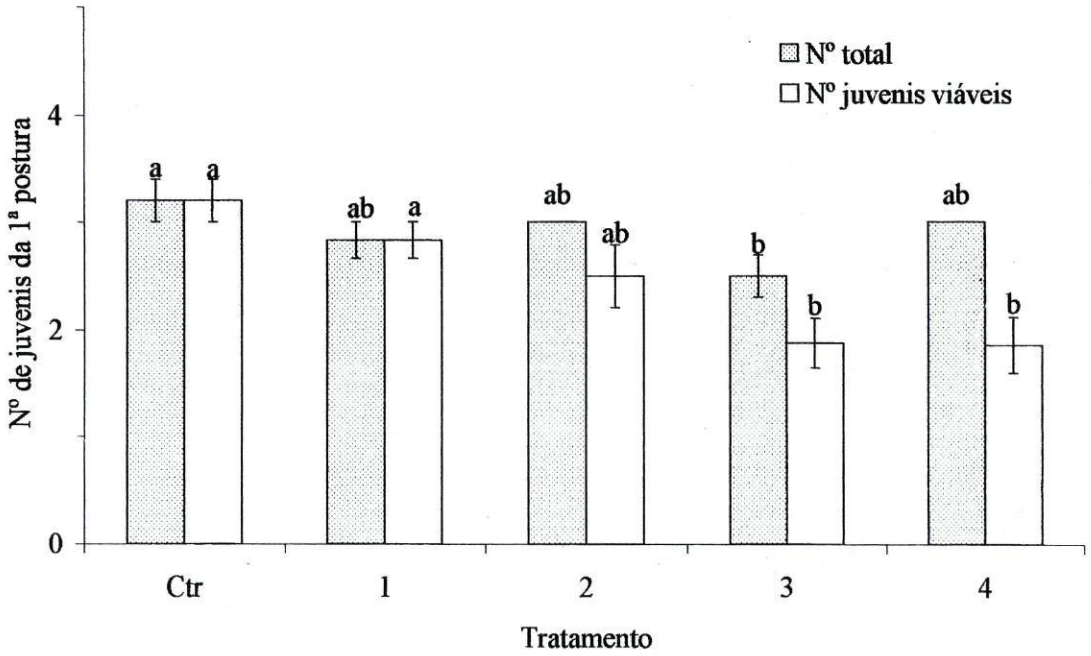


Figura 2.4.5. Número total de juvenis e número de juvenis viáveis libertados na primeira postura por *D. pulicaria*, após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Os valores apresentados correspondem à média dos juvenis produzidos pelas fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. Ctr - tratamento controlo; 1 a 6 - dia de exposição ao tóxico.

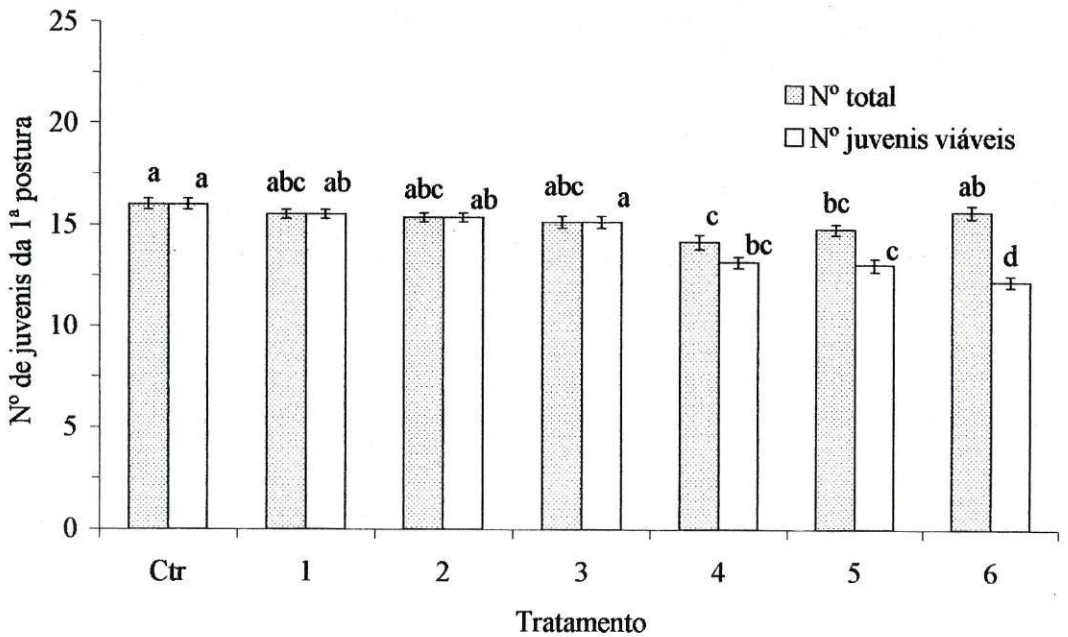


Figura 2.4.6. Número total de juvenis e número de juvenis viáveis libertados na primeira postura por *D. magna*, após os diferentes períodos de exposição ao extracto de *M. aeruginosa*. Os valores apresentados correspondem à média dos juvenis produzidos pelas fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. Ctr - tratamento controlo; 1 a 6 - dia de exposição ao tóxico.

2.4.5. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os indivíduos de *Daphnia* têm, durante o período juvenil, fases que apresentam diferentes sensibilidades a *M. aeruginosa*. Os indivíduos mais jovens foram mais sensíveis do que os mais velhos, uma vez que o aumento da idade dos indivíduos expostos resultou num aumento da sobrevivência (Figura 2.4.1.). De modo geral, os estádios juvenis são mais sensíveis à exposição a tóxicos do que os estádios adultos (Lagadic *et al.*, 1994). Em ensaios de toxicidade com *Daphnia* e *M. aeruginosa* têm sido encontrados resultados semelhantes (Lampert, 1981b; Nizan *et al.*, 1986; Reinikainen *et al.*, 1994). Um aumento da sobrevivência com a idade dos juvenis de *D. pulicaria* é referido por Lampert (1981b), que verificou que *M. aeruginosa* era tóxica para indivíduos recém-nascidos e juvenis com quatro e seis dias de idade. Juvenis com menos de 24 horas de idade e fêmeas adultas de *D. pulex* alimentadas com *M. aeruginosa* apresentam diferenças de sensibilidade, que estão associadas à disponibilidade de alimento de boa qualidade (*Scenedesmus sp.*) (Reinikainen *et al.*, 1994). Para baixas concentrações de cianobactérias e de *Scenedesmus sp.*, a sobrevivência dos juvenis é superior à registada nos indivíduos adultos. A sua superior capacidade fisiológica para enfrentar uma situação de ausência de alimento e presença de toxinas foi atribuída às reservas lipídicas de origem materna que os juvenis são portadores (Reinikainen *et al.*, 1994). Neste trabalho, os indivíduos mais novos, provavelmente portadores de mais reservas, foram os mais afectados e não ocorreu limitação de alimento. Este facto sugere que a maior sensibilidade dos indivíduos nos primeiros estádios do seu ciclo de vida está provavelmente associada a outro factor. A ausência nos estádios mais jovens de mecanismos de desintoxicação eficientes, apesar de relativamente a cianobactérias e *Daphnia* ser meramente especulativo, tem sido referido como possível responsável pelas diferenças de sensibilidade encontradas entre indivíduos de diferentes idades (Reinikainen *et al.*, 1998). As concentrações de extracto utilizadas neste teste foram semelhantes aos valores de CL_{50} às 48 horas determinados no capítulo 2.2. deste trabalho. No entanto, neste ensaio a sobrevivência foi superior, provavelmente porque o tempo de exposição ao extracto tóxico foi inferior e foi fornecido alimento durante a exposição.

A libertação periódica do exoesqueleto em *Daphnia*, que antecede o período de crescimento dos indivíduos, ocorre quer durante a fase juvenil quer durante a fase adulta, embora com diferente periodicidade. Durante a fase juvenil, ocorrem normalmente cinco a seis mudas e na fase adulta este fenómeno sucede a libertação dos juvenis da câmara de incubação. Nos períodos de muda, os Artrópodes, são especialmente sensíveis a poluentes

(Lagadic *et al.*, 1994). O aumento de sensibilidade durante esta fase já foi também referido para *Daphnia* (Lee e Buikema, 1979; Peters, 1987). Num ensaio com cromato de potássio e fêmeas adultas de *D. pulex*, os animais que estavam perto de mudar ou que tinham mudado o exoesqueleto imediatamente antes da exposição apresentaram taxas de sobrevivência mais baixas do que os organismos que se encontravam em fase inter-muda (Lee e Buikema, 1979). Estes autores referem ainda que o processo de muda associado à sincronia que normalmente ocorre numa cultura, pode levar a resultados falsos em testes de toxicidade aguda. Neste trabalho, a divisão da fase juvenil foi feita com base em períodos de vinte e quatro horas e não nos vários estádios da fase juvenil associados à ocorrência de muda, de forma a contornar em termos práticos, as dificuldades que surgem no controlo do tempo de exposição dos organismos ao tóxico, que pode constituir uma fonte de variabilidade nos resultados obtidos. Uma vez que os organismos apresentaram ligeiras diferenças de sincronia na altura em que ocorria a muda, alguns dos organismos libertaram o exoesqueleto durante o período de 24 horas em que estiveram em contacto com o extracto tóxico, enquanto outros não. Neste trabalho, não foi feito um controlo suficientemente rigoroso da altura da ocorrência da libertação do exoesqueleto e da presença do extracto tóxico, que permita associar estes dois aspectos. Uma vez que os testes com as três espécies foram feitos de forma independente e foram obtidos padrões de sobrevivência semelhantes, a maior sensibilidade dos indivíduos expostos durante os períodos um e dois parece não ser devida a uma sincronia acidental das mudas nestes dois períodos. No entanto, é provável que o fenómeno da muda interfira com a sensibilidade dos organismos a *M. aeruginosa*. As toxinas presentes no extracto podem interferir directamente com os processos fisiológicos associados à mudança de exoesqueleto ou, então, podem atingir mais facilmente o corpo dos organismos, devido à deficiência em cálcio do novo exoesqueleto ou ao aumento de volume do corpo que ocorre no período imediatamente antes da libertação da muda. A entrada de água responsável pelo aumento de volume do corpo (Ruppert e Barnes, 1994), pode ainda constituir uma forma facilitada de entrada das toxinas no corpo do organismo.

Para além da diminuição da sobrevivência foi também registado, neste trabalho, um aumento da idade da fêmea na altura da libertação da primeira postura e a redução das dimensões do corpo, evidenciando a interferência do extracto respectivamente na reprodução e no crescimento dos organismos (Figuras 2.4.2. e 2.4.3.). Estes efeitos foram particularmente evidentes nos indivíduos expostos durante as fases iniciais da sua fase juvenil, o que evidencia, mais uma vez, a maior sensibilidade dos indivíduos mais jovens.

As cianobactérias não tóxicas, quando fornecidas como alimento provocam alterações negativas em alguns parâmetros do ciclo de vida de *Daphnia*, que são o resultado da combinação dos efeitos provocados pela interferência mecânica, redução da alimentação noutras partículas e inadequado valor nutricional. Os efeitos no ciclo de vida incluem aumento da mortalidade, redução do crescimento do corpo e redução e atraso na reprodução (Holm e Shapiro, 1984; Repka, 1996). *Oscillatoria limnetica*, uma espécie de cianobactéria que é considerada alimento de baixa qualidade para *Daphnia* devido à sua morfologia filamentosa e composição nutricional inadequada, é capaz de assegurar o crescimento e a reprodução de *Daphnia galeata*. Ocorre, no entanto, uma redução do crescimento, diminuição do tamanho do corpo da fêmea no início da reprodução, para além do aumento do número de estádios durante a fase juvenil (Repka, 1997). A exposição, durante um teste de 21 dias, a *M. aeruginosa* tóxica provocou aumento da mortalidade, decréscimo do crescimento, atraso na maturação e redução da produção de descendentes, que foram atribuídos a deficiências nutricionais e à toxicidade da cianobactéria utilizada (Hietala *et al.*, 1995). No ciclo de vida dos cladóceros, quando os indivíduos são mantidos desde recém-nascidos até um estádio adulto em condições de limitação de alimento, ocorre redução das dimensões do corpo, traduzido sobretudo em termos de biomassa, o número de estádios até um dado ponto do ciclo de vida (por exemplo, início da reprodução) aumenta e ocorre, ainda, a redução da fecundidade (Duncan, 1989). Neste teste, não ocorreu interferência mecânica com o processo de alimentação devido ao facto de *M. aeruginosa* ter sido fornecida sob a forma de extracto dissolvido. Pode, no entanto, ter ocorrido redução da alimentação por interferência das toxinas com o processo de filtração, apesar da exposição ao extracto só ter sido feita durante um curto período de tempo (24 horas). A redução do crescimento e da reprodução registadas podem, assim, ser atribuídas a deficiências de nutrientes provocadas pela redução da alimentação em *Chlorella* e pela presença de toxicidade.

O crescimento, em *Daphnia*, resulta do aumento do número de células da epiderme que está coberta pela cutícula e que ocorre durante o período intermudas (Beaton e Hebert, 1994). No entanto, devido à natureza rígida da cutícula, o crescimento normalmente só ocorre no momento da muda. Em cada estádio (período compreendido entre duas mudas), as células epidérmicas de *D. magna* e de *D. pulex* completam um só ciclo celular, permanecendo a maior parte do tempo na fase G1 (Beaton e Hebert, 1994). A replicação do DNA ocorre logo após a muda, ao que se segue uma fase de intensa actividade mitótica, de forma que o período

de proliferação celular fica restrito a um curto período de tempo após a libertação do exoesqueleto (Beaton e Hebert, 1994).

Para além dos processos de mitose e replicação do DNA já referidos, durante o ciclo celular das células eucarióticas ocorrem ainda outros processos, nomeadamente a síntese de RNA e de proteínas para a mitose (fase G2), a diminuição da síntese proteica durante a mitose, a síntese de histonas durante o período S, e a sua fosforilação (especialmente da H1) durante a condensação da cromatina (De Robertis e De Robertis, Jr., 1987).

As fosfatases que têm actividade nos resíduos de serina e treonina fosforilados estão presentes em todos os tipos de células eucarióticas e participam no controlo de um grande número de processos celulares, entre os quais se salienta o ciclo celular, a proliferação celular, a síntese proteica, a regulação da transcrição e a neurotransmissão (Cohen, 1989). São ainda capazes de influenciar a actividade das nucleoproteínas, nomeadamente das histonas H1 e H2B (Ingebritsen e Cohen, 1983). As microcistinas são capazes de inibir a actividade das fosfatases proteicas do tipo 1 e 2A (DeMott e Dhawale, 1995) e são, por isso, potenciais responsáveis pelos efeitos negativos que *M. aeruginosa* provoca no crescimento de *Daphnia* durante a sua fase juvenil. Humpage e Falconer (1999), ao estudarem os efeitos *in vitro* de MCYST-LR numa cultura de hepatócitos, verificaram que a acção da toxina não era idêntica para todas as células da população. Este comportamento selectivo foi atribuído a diferentes taxas de entrada das toxinas nas subpopulações de hepatócitos e, também, ao facto de as células se encontrarem em diferentes fases do seu ciclo de vida, na altura da exposição.

O tipo de efeito provocado nos cladóceros está ainda dependente do estádio de desenvolvimento em que os indivíduos se encontram. Os organismos expostos durante os últimos estádios do período juvenil (Figura 2.4.2.) não mostraram atraso significativamente diferente do registado no controlo, nem na idade ou no tamanho do corpo da fêmea na altura da primeira postura (com excepção de *D. magna*). Os efeitos no crescimento foram mais acentuados nos indivíduos expostos durante as fases iniciais, contrariamente aos registados na reprodução que se manifestaram de forma mais acentuada nos indivíduos expostos durante a fase adolescente. Numa primeira fase do período juvenil onde ocorre principalmente a disponibilização de recursos para o crescimento somático (Threlkeld, 1987) e em que o desenvolvimento do aparelho reprodutor ainda não é completo, as toxinas de *Microcystis* parecem influenciar de forma mais acentuada os processos relacionados com o crescimento. A exposição ao tóxico na fase final do período juvenil em que os organismos apresentam os

ovos em desenvolvimento no ovário (Zaffagnini, 1987) interfere sobretudo com os processos relacionados com a preparação da reprodução.

Diferenças de sensibilidade entre *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* foram já referidas nos capítulos anteriores. Neste estudo, *D. magna* é novamente a espécie menos sensível se considerarmos as concentrações de extracto a que os organismos foram expostos. As diferenças interespecíficas encontradas nos resultados podem, ainda, dever-se ao facto de o tempo de exposição utilizado não ter sido suficiente para induzir uma resposta significativa nos indivíduos menos sensíveis. Machácek (1995) ao avaliar durante os vários estádios da fase juvenil de *D. galeata* os efeitos de um composto químico exsudado por peixes, verificou que a exposição durante o período de tempo correspondente a um só estádio não era suficiente para induzir efeitos significativos em vários parâmetros do ciclo de vida. Foi ainda observado que os juvenis do primeiro estádio que ainda não necessitam de optar entre distribuir os recursos para o crescimento somático ou reprodução apresentam baixa sensibilidade ao referido composto químico. Em *D. magna* e *D. pulex* ocorrem diferentes padrões de mitoses, consoante a região do corpo. Existem também evidências de que o tempo e a duração da actividade mitótica é específica do estádio do ciclo de vida (Beaton e Hebert, 1994). Para além das diferenças referidas, *D. magna* duplica o número de células epidérmicas em apenas um estádio, enquanto que em *D. pulex* o aumento do número de células é apenas de 60% (Beaton e Hebert, 1994). Os aspectos atrás referidos, que evidenciam diferenças entre as espécies, simultaneamente com a diferença de sensibilidade às toxinas, poderão contribuir para as diferenças interespecíficas observadas.

De modo geral, verificou-se que a exposição durante a fase juvenil, mesmo por períodos de pouca duração, provoca, para além da diminuição da sobrevivência, um atraso no início da reprodução, uma diminuição no tamanho da fêmea na altura da primeira postura, a redução do tamanho da postura e da viabilidade dos juvenis. No início da fase juvenil, o crescimento e a sobrevivência foram os parâmetros mais afectados. No fim do período juvenil, o extracto tóxico de *M. aeruginosa* alterou principalmente a reprodução, quantitativa e qualitativamente.

2.5. Toxicidade das células intactas de *M. aeruginosa* em *Daphnia*

2.5.1. Introdução

Nos ecossistemas eutróficos, as cianobactérias provocam o declínio das populações de cladóceros através do seu efeito letal directo e por redução da alimentação através da interferência mecânica das colónias e filamentos com o aparelho filtrador (Lampert, 1981a; 1982; De Mott *et al.*, 1991; Gliwicz, 1977; Porter e Orcutt, 1980; Infante e Abella, 1985). As cianobactérias unicelulares ou coloniais de pequenas dimensões, quando ingeridas não são facilmente digeridas nem assimiladas e, além disso, podem ter um inadequado valor nutricional para o zooplâncton (Arnold, 1971; Porter e Orcutt, 1980; Holm *et al.*, 1983; Holm e Shapiro, 1984). Entre os aspectos responsáveis pela baixa eficiência na assimilação das cianobactérias pelos cladóceros, refere-se a presença de compostos tóxicos e a falta de nutrientes essenciais (De Bernardi e Giussani, 1990). As camadas gelatinosas que protegem as células e colónias impedem também que ocorra a sua digestão de forma eficiente (Porter, 1973; Kobayashi, 1992). Estes efeitos negativos das cianobactérias não são mutuamente exclusivos e podem agir simultaneamente, uma vez que as cianobactérias podem ser simultaneamente coloniais e tóxicas. As cianobactérias unicelulares, e não produtoras de toxinas conhecidas, fazem também decrescer a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Daphnia* quando comparadas com outros elementos do fitoplâncton (Brett, 1993).

A obtenção de toxinas puras em quantidade suficiente para efectuar experiências em condições controladas é um dos problemas associados ao estudo das cianobactérias. Recorre-se, por isso, frequentemente à utilização de extractos, que relativamente à toxina pura têm a

vantagem de reconstituir de forma mais fiel a situação do meio natural. Uma das desvantagens é que a interpretação dos resultados do ensaio pode ficar limitada pela possibilidade da existência de compostos desconhecidos com características químicas muito diferentes (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999a).

As células das cianobactérias são geralmente mais tóxicas para o zooplâncton do que os extractos e do que as toxinas puras. DeMott *et al.* (1991) ao estudarem a toxicidade das células intactas de *M. aeruginosa* e da microcistina-LR verificaram que quando forneciam toxinas puras era necessário o equivalente a 10 mg/ml de *Microcystis* tóxica para provocar mortalidade em *Daphnia*. Quando forneciam células intactas eram apenas necessárias 0,2 µg/ml para causar inibição da alimentação e mortalidade após ingestão. Jungmann *et al.* (1991) ao compararem os efeitos de células intactas de *Microcystis* e vários tipos de extractos na taxa de filtração de *D. pulicaria* verificaram que as células intactas eram sempre mais inibidoras do que os extractos celulares e que a extracção das partículas lipofílicas removia completamente o factor inibidor das células. DeMott *et al.* (1991) também verificaram que as taxas de filtração eram reduzidas apenas na presença de células intactas. *M. aeruginosa* pode inibir a ingestão de alimento em *Daphnia*, por redução da frequência e da eficiência do transporte de alimento pelas contracções maxilares, o que origina decréscimo da ingestão de alimento e redução do tamanho do bolo alimentar (Rohrlack *et al.*, 1999b). Os polissacarídeos da mucilagem de *Microcystis* provocam interferência mecânica com as maxílulas, originando o seu movimento anormal e os efeitos negativos atrás descritos. A camada mucilaginosa das cianobactérias também é causadora de interferência negativa no manuseamento e ingestão de colónias e filamentos pelo Crustáceo *Acanthodiaptomus denticornis* (Goarant, 1994). Este autor refere ainda que esta camada actua como defesa química, e que a sua espessura é o factor que comanda a resistência das células à digestão.

2.5.2. Objectivos

A avaliação da toxicidade das células de cianobactérias, utilizando toxinas puras e extractos celulares permite controlar a dose a que se expõem os organismos e no caso do zooplâncton, é independente do modo de alimentação (DeMott e Dhawalle, 1995). No entanto, no meio natural, os efeitos de *Microcystis* no zooplâncton são devidos principalmente à ingestão de células tóxicas e não à exposição às toxinas em solução (Lampert, 1981a), a não ser nas fases em que ocorre a libertação das toxinas para o meio, devido à morte e decomposição das células.

Foram objectivos deste trabalho, avaliar os efeitos das células intactas de uma estirpe tóxica e de uma não tóxica de *M. aeruginosa* na sobrevivência e na reprodução de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*. Pretendeu-se ainda avaliar a existência de diferenças de sensibilidade entre as espécies de cladóceros estudadas.

2.5.3. Material e Métodos

2.5.3.1. Preparação das células de *M. aeruginosa*

As células de *M. aeruginosa* utilizadas nos testes pertenciam às estirpes IZANCYA 2 e IZANCYA 4 (Vasconcelos, 1995a). A sua cultura em laboratório foi feita de acordo com a metodologia descrita na secção 2.1.4. deste trabalho. As células de IZANCYA 4 para utilização nos testes foram obtidas de culturas que foram colocadas em funis de decantação durante 24 horas, para que ocorresse a sedimentação das células. O material recolhido do fundo foi posteriormente centrifugado, a 4000 rpm, durante 30 minutos, de forma a efectuar-se a total remoção do meio de cultura. As células obtidas foram ressuspensas em meio de cultura M4 e posteriormente utilizadas nos testes. As células de IZANCYA 2 foram removidas do meio de cultura por centrifugação a 4000 rpm durante 45 minutos, sendo igualmente ressuspensas em meio de cultura M4. A concentração das suspensões obtidas foi determinada por contagem das células utilizando um hemocitómetro (câmara de Neubauer).

2.5.3.2. Procedimentos gerais

Durante vinte e um dias, foram fornecidas diariamente a indivíduos de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* células de *C. vulgaris* e de *M. aeruginosa* da estirpe tóxica IZANCYA 2 já utilizada anteriormente e da estirpe IZANCYA 4, considerada não tóxica em bioensaio com murganhos (Vasconcelos, 1995a). Os testes foram efectuados em condições semi-estáticas, com um intervalo de renovação do meio de 48 horas, à temperatura de 20 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz: 8 horas de escuro. Foram utilizados indivíduos juvenis com menos de vinte e quatro horas de idade, obtidos de fêmeas em cultura individual. No início do teste, os juvenis foram distribuídos aleatoriamente pelo controlo e pelos vários tratamentos, tendo sido utilizados 10 indivíduos em cultura individual por controlo e por tratamento. Os indivíduos do grupo controlo e os dos tratamentos com as duas estirpes de cianobactérias, foram alimentados diariamente com *C. vulgaris*. *D. pulex e D. pulicaria* foram alimentadas com $1{,}75 \times 10^5$ células por mililitro e *D. magna* com $2{,}5 \times 10^5$ células por mililitro. No teste com *D. pulex* foram efectuados três tratamentos com a estirpe IZANCYA 2 de *M. aeruginosa*

constituídos por 0,3, 3 e $30x10^3$ células por mililitro de *M. aeruginosa* adicionadas diariamente e em simultâneo com as células de *C. vulgaris*. Foi ainda feito um tratamento com IZANCYA 4, em que foram adicionadas 10^5 células por mililitro e um tratamento denominado jejum em que não foi fornecido qualquer tipo de alimento. No teste com *D. pulicaria*, para além do controlo e dos tratamentos IZANCYA 4 e jejum, idênticos aos anteriormente referidos para *D. pulex*, as concentrações utilizadas nos tratamentos com IZANCYA 2 foram 2, 4 e $8x10^3$ células por mililitro. No teste com *D. magna*, os tratamentos com IZANCYA 4 e o tratamento jejum foram idênticos aos referidos para as outras duas espécies. Nos tratamentos com IZANCYA 2 foram fornecidas diariamente 3, 30 e $300x10^3$ células por mililitro. Diariamente, foram efectuadas observações em todos os indivíduos, registando-se a mortalidade, o número de juvenis libertados em cada postura e a sua viabilidade. A concentração de oxigénio dissolvido e os valores de pH foram medidos semanalmente em três recipientes de cada tratamento.

2.5.3.3. Análise estatística

Os efeitos das células das duas estirpes de *M. aeruginosa* no ciclo de vida das espécies de *Daphnia* foram avaliados através do estudo da mortalidade e da duração da fase juvenil (idade da fêmea na primeira postura). Foram ainda determinados os efeitos na reprodução através do número total de juvenis e do número de juvenis viáveis produzidos por fêmea, após os 21 dias de teste. Os descendentes das fêmeas que morreram antes dos 21 dias de teste não foram incluídos na análise. Os efeitos na mortalidade foram avaliados usando o Teste Exacto de Fisher (EPA, 1989). A existência de diferenças significativas entre os vários tratamentos para os outros parâmetros estudados foi avaliada através de uma análise de variância unifactorial. Quando surgiram diferenças significativas foi utilizado o Teste de Tukey. Os pressupostos da ANOVA foram testados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade e o teste de Bartlett para a homogeneidade de variâncias (Zar, 1996). Os dados referentes à idade de *D. magna* na primeira postura foram transformados utilizando a transformação logarítmica (log x), de forma a garantir a homogeneidade das variâncias.

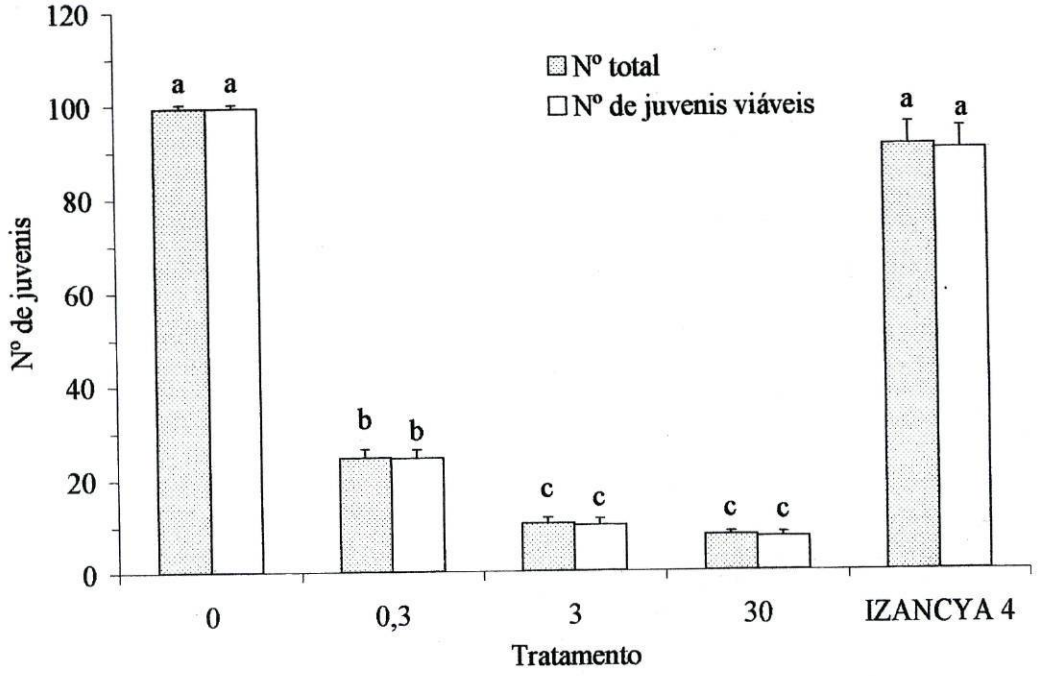


Figura 2.5.6. Número total de juvenis e número de juvenis viáveis libertados no teste por *D. magna*. Os valores apresentados correspondem à média dos juvenis produzidos pelas fêmeas que em cada tratamento sobreviveram até ao final do teste e respectivos erros padrão. Letras (a, b, c) diferentes representam valores médios significativamente diferentes, determinados pelo Teste de Tukey. 0 - tratamento controlo; 0,3, 3 e 30 - tratamentos com a estirpe tóxica IZANCYA 2; IZANCYA 4 - tratamento com a estirpe não tóxica.

A partir dos valores do número total de juvenis e do número de juvenis viáveis obtidos no final do teste, não foi possível calcular os valores de CE_{50} para a inibição da reprodução. Os valores de CEO e de CENO para a reprodução das três espécies encontram-se na Tabela 2.5.3..

Tabela 2.5.3. Valores de CENO e de CEO para a inibição da reprodução dos organismos, calculados com base no número total de juvenis e no número de juvenis viáveis libertados.

	CENO (10^3 cél./ml)		CEO (10^3 cél./ml)	
	Nº total juvenis	Nº juvenis viáveis	Nº total juvenis	Nº juvenis viáveis
D. pulex	1	1	3	3
D. pulicaria	< 2	-	2	-
D. magna	< 0,3	< 0,3	0,3	0,3

2.5.5. Discussão

Durante as experiências, os valores de oxigénio dissolvido no meio e de pH mantiveram-se dentro dos valores referidos nas normas da OECD (1993).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que as células da estirpe tóxica de *M. aeruginosa* interferiram negativamente com os indivíduos de *Daphnia*, diminuindo a sua sobrevivência e reduzindo o seu desempenho reprodutivo, enquanto as da estirpe não tóxica apenas reduziram a eficiência da reprodução.

A estirpe tóxica de *M. aeruginosa* (IZANCYA 2) provocou um aumento da mortalidade das três espécies, enquanto a sobrevivência dos indivíduos submetidos ao tratamento com a estirpe não tóxica (IZANCYA 4) não sofreu redução (Figura 2.5.1.). Este resultado evidencia a diferença de toxicidade entre as duas estirpes de *M. aeruginosa* estudadas, que foi inicialmente definida com base nos resultados de bioensaios com murganhos (Vasconcelos, 1995a). Todavia, importa salientar que a toxicidade das cianobactérias para Mamíferos (murganhos) pode ser diferente da toxicidade para cladóceros. Algumas espécies e estirpes de cianobactérias definidas como não tóxicas através de bioensaios com murganhos interferem negativamente com os cladóceros provocando redução da taxa de alimentação, mortalidade e diminuição da sua capacidade de competição com os rotíferos (Nizan *et al.*, 1986; Reinikainen *et al.*, 1995b; Sartonov, 1995; Yasuno *et al.*, 1998). Existem também referências a cladóceros resistentes a células de estirpes hepatotóxicas para murganhos e a microcistinas puras (Nizan *et al.*, 1986; Yasuno e Sugaya, 1991; Jungmann e Benndorf, 1994; Yasuno *et al.*, 1998). As diferenças de sensibilidade à toxicidade das cianobactérias existentes entre cladóceros e Mamíferos têm sido atribuídas à presença nas cianobactérias de outros compostos, para além das toxinas conhecidas, que são tóxicos para os cladóceros (Jungmann *et al.*, 1991; Reinikainen *et al.*, 1994; Jungmann e Benndorf, 1994; Jungmann, 1992; 1995). Alguns dos trabalhos que comparam os dois tipos de ensaios utilizam resultados de testes que foram efectuados com cianobactérias obtidas de culturas diferentes e em que não foram quantificadas as microcistinas presentes. As diferenças de toxicidade encontradas podem ainda ser devidas a diferentes concentrações de toxinas resultantes de culturas em diferente fases de crescimento ou efectuadas em diferentes condições ambientais.

A sobrevivência dos indivíduos dos tratamentos com a estirpe tóxica, principalmente nas concentrações mais elevadas, é inferior à registada no tratamento jejum, com excepção do teste com *D. magna*. De referir, no entanto, que para esta espécie 80 % da mortalidade dos indivíduos mantidos em jejum ocorreu entre o 18º e o 20º dia do teste. As deficiências

nutricionais e a influência negativa que *Microcystis* pode ter no processo de alimentação são apontados por muitos autores como possíveis responsáveis pela mortalidade dos indivíduos (Arnold, 1971; Porter e Orcutt, 1980; Porter e McDonough, 1984; Brett, 1993; Hietala *et al.*, 1995). Neste estudo, estes factores parecem não poder ser responsáveis pela mortalidade, uma vez que os indivíduos dos tratamentos com IZANCYA 2, estando na presença de alimento de boa qualidade apresentaram uma mortalidade superior à registada no jejum. Resultados semelhantes foram encontrados por Jungmann *et al.* (1991) ao avaliarem a toxicidade de três estirpes de *Microcystis* para *D. pulicaria*. De salientar, ainda, que a estirpe IZANCYA 2 apresentava-se unicelular ou, no máximo, com arranjos de duas células, o que permite colocar de parte os efeitos negativos da interferência mecânica com o aparelho filtrador. A redução da sobrevivência nos tratamentos com IZANCYA 2, uma vez que foi superior à registada no jejum, poderá ser devida à toxicidade desta estirpe.

A toxicidade de *M. aeruginosa* para *Daphnia* decresce com o aumento da concentração de alimento disponível (Hietala *et al.*, 1997). Em testes em que não é fornecido alimento, a mortalidade dos indivíduos juvenis é geralmente muito elevada, não chegando estes a atingir a fase reprodutiva (Reinikainen *et al.*, 1994). Neste trabalho, optou-se por fornecer uma pequena quantidade de *C. vulgaris*, de forma a melhorar o estado nutricional dos indivíduos e a reduzir a mortalidade dos juvenis nos primeiros dias de vida, fazendo com que estes pudessem atingir a fase adulta, e nos permitisse estudar os efeitos de *M. aeruginosa* na reprodução.

Nos tratamentos com IZANCYA 2, a idade das fêmeas de *D. magna* e *D. pulicaria* na altura da libertação da primeira postura sofreu um aumento, que foi concordante com o aumento da concentração de células tóxicas fornecidas (Figura 2.5.2.) Estes resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores (Hietala *et al.*, 1995; Laurén-Määttä *et al.*, 1996; Hietala *et al.*, 1997). Para *D. pulex* esta relação não se verificou e, contrariamente ao esperado, os indivíduos da concentração $0{,}3 \times 10^3$ e 3×10^3 cél./ml de IZANCYA 2 tiveram uma fase juvenil mais curta (Figura 2.5.2.). A adição de uma pequena quantidade de células de *M. aeruginosa* hepatotóxica melhora a sobrevivência de *Daphnia* relativamente ao jejum (DeMott *et al.*, 1991). Neste trabalho e para *D. pulex*, a adição de IZANCYA 2 pode ter melhorado o estado nutricional e permitido a redução da duração da fase juvenil. A estirpe não tóxica, contrariamente ao esperado, atrasou o início da reprodução das três espécies. As cianobactérias não tóxicas também podem atrasar o início da reprodução; no entanto, este efeito é normalmente atribuído à interferência mecânica das colónias ou dos filamentos, à redução da alimentação e à deficiente composição nutricional (Holm e Shapiro, 1984; Repka,

1996; 1997). A estirpe IZANCYA 4, apesar de não ser produtora de microcistinas pode apresentar na sua composição outros compostos químicos que interfiram com o processo de alimentação de *Daphnia*. Jungmann *et al.* (1991) separaram os compostos responsáveis pela toxicidade e pela inibição da taxa de filtração de *Daphnia* e referem que estes dois aspectos são causados por compostos químicos diferentes. A toxicidade das cianobactérias não tóxicas para Mamíferos é, em parte, devida á presença na superfície celular e na camada mucilaginosa das espécies coloniais de compostos tóxicos. Rohrlack *et al.* (1999a) ao estudarem a sobrevivência e a taxa de ingestão de *Daphnia galeata* na presença de uma estirpe de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas e de uma sua mutante inibida geneticamente de sintetizar qualquer variante desta toxina, concluíram que as microcistinas são a principal causa da mortalidade mas a inibição da ingestão de alimento é feita por outro composto desconhecido. *M. aeruginosa* pode inibir a ingestão de alimento em *Daphnia*, por redução da frequência e da eficiência do transporte de alimento pelas contracções maxilares, o que resulta num decréscimo da taxa de ingestão e do tamanho do bolo alimentar (Rohrlack *et al.*, 1999b). Estes efeitos negativos estão relacionados com os polissacarídeos da mucilagem das células (Rohrlack *et al.*, 1999a,b). As microcistinas são endotoxinas e a sua libertação para o meio só se faz após lise celular. No entanto, têm sido encontrados nas cianobactérias evidências de compostos tóxicos que são libertados para o meio extracelular. O filtrado obtido a partir de uma suspensão de filamentos de *Anabaena* provocou um decréscimo no número de batimentos dos apêndices toráxicos de *Daphnia carinata* (Forsyth *et al.*, 1992). Yasuno e Sugaya (1991) referem a presença em *Microcystis viridis* de uma exotoxina, que apenas se encontra nas células intactas e que é letal para *Moina macrocopa*.

Os indivíduos das três espécies de *Daphnia* alimentados com a estirpe IZANCYA 2 de *M. aeruginosa* para além de iniciarem a sua fase reprodutiva mais tardiamente, reduziram o número de posturas libertadas e produziram um menor número de juvenis ao fim dos 21 dias de teste. Resultados semelhantes foram obtidos por Hietala *et al.* (1995), Hietala *et al.* (1997) e Reinikainen *et al.* (1999). Estes resultados podem ser atribuídos quer ao efeito das toxinas na reprodução quer a deficiências nutricionais, uma vez que a redução do alimento disponível provoca efeitos semelhantes na reprodução (Boersma e Vijverberg, 1994).

D. pulex e *D. magna* apresentaram, ainda, redução da viabilidade dos juvenis libertados para as duas estirpes de *Microcystis* (Figuras 2.5.4., 2.5.5. e 2.5.6.). Um decréscimo da viabilidade dos ovos de *D. pulex* na presença de células de *M. aeruginosa* produtoras de microcistinas foi também registado por Reinikainen *et al.* (1995a). Para além do efeito das

toxinas, possivelmente mediado através da transferência de lípidos que a fêmea efectua para os ovos, estes resultados foram atribuídos a um aumento da vulnerabilidade dos organismos devido à presença prolongada de um factor de stress e de fracas condições nutricionais (Reinikainen *et al.*, 1995a).

O valor de CL_{50} no final do teste para *D. pulex* foi de $3{,}33 \times 10^3$ cél./ml e para *D. pulicaria* foi $4{,}86 \times 10^3$ cél./ml, o que permite classificar *D. pulex* como a espécie mais sensível às células de *M. aeruginosa*. Os valores de mortalidade obtidos no teste com *D. magna* não permitiram calcular o valor de CL_{50} pelo método "probit". No entanto, atendendo a que na concentração de 300×10^3 cél./ml a sobrevivência de *D. magna* foi de 80 % (Figura 2.5.1.), esta espécie foi a menos sensível, o que está de acordo com os resultados obtidos nos capítulos 2.2., 2.3. e 2.4.. Com base nos valores de CENO e de CEO para a sobrevivência (Tabela 2.5.2.), *D. pulex* foi também a espécie mais sensível seguida, por ordem decrescente, de sensibilidade por *D. pulicaria* e *D. magna*.

A estirpe não tóxica IZANCYA 4, apesar de não produzir microcistinas, interferiu com a reprodução das três espécies de *Daphnia* de forma diferente. *D. pulex* registou um decréscimo no número de posturas libertadas e no número de juvenis viáveis. Na reprodução de *D. pulicaria* apenas ocorreu redução significativa no número total de juvenis e não foram detectados juvenis inviáveis nos tratamentos com as duas estirpes de *Microcystis*. *D. magna* apenas sofreu redução significativa do número de posturas libertadas. Estas diferenças de resultados, simultaneamente com os valores de CENO e CEO obtidos para a reprodução (Tabela 2.5.3.), evidenciam, mais uma vez, diferenças de sensibilidade entre as três espécies.

De um modo geral, a estirpe que não produz microcistinas não reduziu a sobrevivência, embora tenha alterado, de forma semelhante à estirpe tóxica, a reprodução das três espécies. De salientar que a sensibilidade das espécies foi diferente consoante se considerou a sobrevivência ou a reprodução. *D. magna* foi a espécie menos sensível em termos de sobrevivência e a mais sensível na reprodução. Os indivíduos de *Daphnia* apresentam diferenças interespecíficas relativamente à intensidade da inibição das taxas de filtração pelas cianobactérias (Lampert, 1982; DeMott *et al.*, 1991). Esta diferença de sensibilidade pode estar relacionada com a presença nas células de dois ou mais compostos tóxicos diferentes que interferem de forma diferencial com a sobrevivência e com a reprodução.

As diferenças de toxicidade podem ser devidas a diferentes modos de administração dos tóxicos (Rand e Petrocelli, 1984; Klaassen *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Moreno-

Garrido *et al.*, 1999). Comparando os resultados obtidos nesta secção com os das secções anteriores que utilizaram extractos aquosos dissolvidos, verifica-se que as células intactas de *M. aeruginosa* foram muito mais tóxicas do que os extractos, o que está de acordo com estudos anteriores (DeMott *et al.*, 1991; Jungmann *et al.*, 1991; Sbiyyaa *et al.*, 1998). As microcistinas, sendo tóxicas para *Daphnia*, parecem perder parte do seu efeito quando são fornecidas dissolvidas na água (DeMott *et al.*, 1991). A administração de MCYST-LR por via oral tem uma toxicidade trinta vezes inferior à registada quando se faz a sua injecção intraperitoneal ou intravenosa (Dahlem *et al.*, 1989). As diferenças de toxicidade encontradas podem dever-se a diferentes modos de entrada das toxinas no corpo dos organismos e ainda ao facto de as toxinas não microcistinas poderem ser destruídas durante os processos de preparação dos extractos.

3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

3.1. Efeito de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia*

3.1.1. Introdução

As neurotoxinas produzidas por espécies e estirpes de cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium* podem ser incluídas em três grupos consoante o modo de actuação. A anatoxina-a e a homoanatoxina-a imitam o efeito da acetilcolina, a anatoxina-a(s) inibe a actividade da enzima acetilcolinesterase e as saxitoxinas, também conhecidas como PSP ("Paralytic Shellfish Poisons") bloqueiam os canais de sódio das células nervosas (Carmichael, 1992; 1997). A anatoxina-a(s) é um ester fosfatado de N-hidroxiguanina cíclica, inicialmente detectado na estirpe de *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 (Matsunaga *et al.*, 1989). Posteriormente, foi também identificada e isolada em florescências e estirpes de *Anabaena lemmermannii* (Henriksen *et al.*, 1997; Onodera *et al.*, 1997). A estirpe NRC 525-17 de *Anabaena flos-aquae*, para além de anatoxina-a(s) produz ainda várias microcistinas (Harada *et al.*, 1991).

No processo de transmissão do impulso nervoso dos neurónios para as células musculares, a acetilcolina libertada da extremidade terminal dos axónios liga-se aos receptores existentes na membrana das células musculares e provoca a abertura dos canais de sódio, induzindo a contracção muscular. A acetilcolinesterase degrada posteriormente a acetilcolina, permitindo aos seus receptores e às células musculares o retorno à situação de repouso. Ao nível da placa motora, a anatoxina–a e a anatoxina-a(s) provocam excessiva estimulação das células musculares por interferência com a actividade do neurotransmissor acetilcolina. A anatoxina–a liga-se aos receptores da acetilcolina e induz a contracção

muscular, mas como não é degradada pela acetilcolinesterase induz a estimulação dos músculos até à exaustão (Carmichael, 1994). A anatoxina-a(s) permite que a acetilcolina se ligue aos seus receptores na membrana pós-sináptica e induza a contracção normal dos músculos mas ao ligar-se à acetilcolinesterase impede que esta degrade a acetilcolina. O neurotransmissor persiste na sinapse e provoca a estimulação contínua dos músculos respiratórios que acabam por parar e provocar a morte por asfixia (Carmichael 1994). Este modo de actuação é semelhante ao dos insecticidas organofosforados (e.g. o paratião). O valor de DL_{50} para ratos injectados por via intraperitoneal com a anatoxina-a(s) é de 20 μg/kg de peso do corpo (Mahmood e Carmichael, 1987). A sobrevivência é de apenas 10 a 30 minutos e os animais apresentam como sintomas espasmo muscular, excessiva salivação e lacrimação, diarreia e incontinência urinária, acabando por morrer (Falconer, 1993).

A neurotoxina anatoxina-a(s) tem uma distribuição geográfica conhecida muito localizada tendo sido apenas encontrada em *A. flos-aquae* no Canadá (Mahmood e Carmichael, 1987) e em *A. lemmermannii* na Dinamarca (Henriksen *et al.*, 1997). As espécies de *Daphnia* estudadas neste trabalho foram obtidas de locais (secção 2.1.) onde nunca foi detectada esta neurotoxina e, por isso, a sua sensibilidade à anatoxina-a(s) não foi influenciada por contacto anterior.

3.1.2. Objectivos

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos de extractos de *M. aeruginosa* (IZANCYA 2) e de *Anabaena flos-aquae* (NRC 525-17) na actividade *in vitro* da acetilcolinesterase de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*. Para além da comparação da sensibilidade das espécies, avaliou-se a viabilidade do ensaio de inibição da actividade enzimática da AChE de *Daphnia* como método de rastreio da presença de anatoxina-a(s).

3.1.3. Material e Métodos

A cultura de *M. aeruginosa* foi feita de acordo com a metodologia descrita na secção 2.1.4. O extracto de *M. aeruginosa* foi preparado a partir de uma suspensão concentrada de células da estirpe IZANCYA 2 (10^9 células/ml), submetida a tratamento por ultra-sons durante 30 minutos e centrifugada a 10000 r.p.m. durante 20 minutos. O sobrenadante foi diluído com água destilada e utilizado como solução de tóxico. A concentração de extracto expressa em células por mililitro foi convertida em peso seco de células utilizando a relação

previamente determinada por DeMott *et al.* (1991) para o peso seco de *Microcystis* 2,04 ± 0,22 EP 10^{-5} µg/célula. O extracto de *Anabaena* foi preparado a partir de células liofilizadas da estirpe NRC 525-17 cedidas pelo Professor V. Vasconcelos do Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências do Porto. As células liofilizadas foram ressuspensas em água destilada (0,003 mg/ml), submetidas a tratamento com ultra-sons durante 20 minutos e centrifugadas, a 10000 r.p.m., durante 10 minutos. O sobrenadante foi diluído com água destilada e utilizado como solução de tóxico.

Os indivíduos de *Daphnia* utilizados nos testes e as respectivas fêmeas progenitoras foram mantidos nas condições de cultura descritas na secção 2.1.3. Nos testes foram utilizadas fêmeas das três espécies, com a primeira postura de ovos recém passada para a câmara de incubação. Os homogeneizados de *Daphnia* para a determinação da actividade da AChE foram preparados em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,2), tendo sido mantidos em gelo durante a homogeneização. O tampão foi preparado por mistura de uma solução de dihidrogénio fosfato de potássio (KH_2PO_4) 0,1 M com uma solução de hidrogénio fosfato dipotássico (K_2HPO_4) 0,1 M. Na preparação dos homogeneizados de *Daphnia* foram utilizados trinta indivíduos de *D. pulex* e de *D. pulicaria* e cinco indivíduos de *D. magna* por mililitro de tampão. A actividade da enzima AChE foi determinada pelo método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) adaptado a microplaca, de acordo com a metodologia descrita em Guilhermino *et al.* (1996a). A 0,250 ml da solução de reacção adicionaram-se 0,1 ml de homogeneizado de *Daphnia*. A solução de reacção era constituída por 30 ml de tampão fosfato (0,1 M), 1 ml do reagente ditiobisnitrobenzoato 10 mM (DTNB) (19,8 mg de ácido ditiobisnitrobenzoato e 7,5 mg de hidrogénio carbonato de sódio em 10 ml de tampão fosfato) e 0,2 ml de uma solução de iodeto de acetilcolina 0,075M. A actividade enzimática foi lida a 405 nm, durante cinco minutos. As amostras foram incubadas durante 45 minutos com várias concentrações dos extractos de *Anabaena* e *Microcystis*. No controlo foi utilizada água destilada. A solução de reacção (tampão, DTNB e substrato) foi usada como branco. Foram efectuadas três réplicas por cada tratamento. A actividade da AChE foi determinada em triplicado e foi expressa em Unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína), correspondendo uma U a uma nanomole de substrato hidrolisado por minuto. A concentração de proteína das amostras foi determinada em triplicado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a microplaca, utilizando γ-globulinas de bovino (Sigma) como padrão. A 0,250 ml do reagente de Bradford diluído em água destilada (6:24) foram adicionados 0,010 ml de amostra. A absorvência foi lida a 595 nm, após um período de incubação de 15 minutos.

Os resultados foram analisados utilizando a ANOVA unifactorial seguida pelo Teste

para comparações múltiplas de Tukey. Os valores de CI_{50} para o extracto neurotóxico foram determinados pelo método probit (Finney, 1971).

3.1.4. Resultados

Os resultados dos ensaios de inibição *in vitro* da actividade da AChE de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna* pelos extractos de *Anabaena* e de *Microcystis* encontram-se representados nas Figuras 3.1.1., 3.1.2. e 3.1.3.

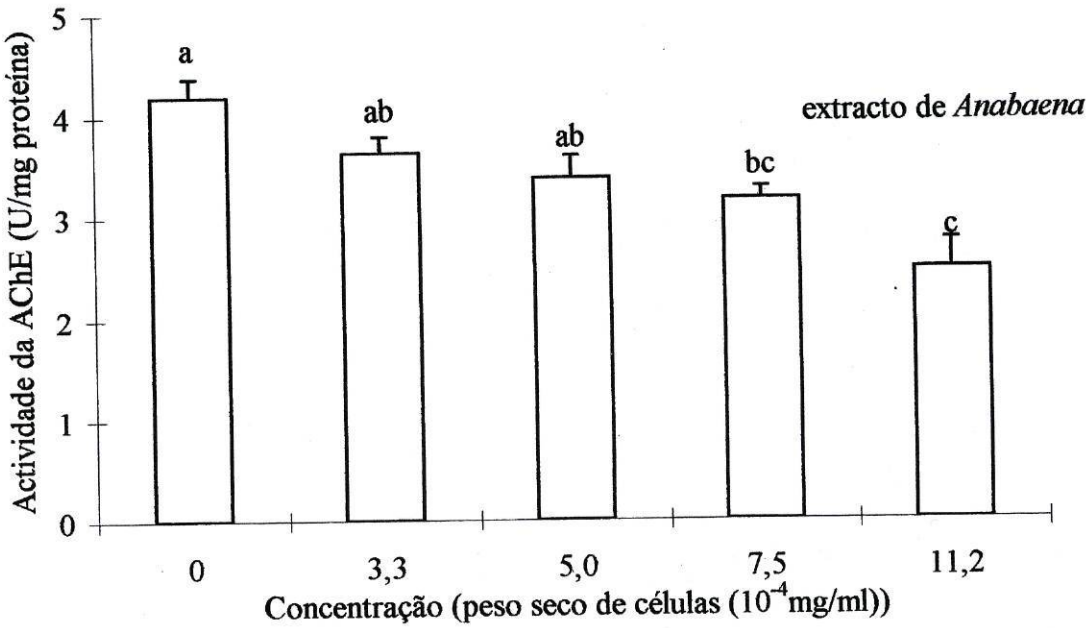
O valor médio da actividade da AChE e respectivo erro padrão determinado nas amostras controlo foi de 4,15 ± 0,329 U/mg de proteína para *D. pulicaria*, 4,09 ± 0,132 U/mg de proteína para *D. pulex* e 5,34 ± 0,588 U/mg de proteína para *D. magna*.

O extracto de *Microcystis* não alterou significativamente a actividade da enzima para as três espécies (*D. pulex*: $F = 2,7$; g.l. = 3, 30; $p > 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 1,8$; g.l. = 3, 32; $p > 0,05$; *D. magna*: $F = 1,7$; g.l. = 3, 32; $p > 0,05$). O extracto de *Anabaena* reduziu significativamente a actividade da AChE para as três espécies (*D. pulex*: $F = 9,6$; g.l. = 4, 40; $p < 0,05$; *D. pulicaria*: $F = 31,6$; g.l. = 4, 40; $p < 0,05$; *D. magna*: $F = 5,7$; g.l. = 4, 38; $p < 0,05$).

Os valores de CENO, CEO e CI_{50} para o ensaio com o extracto de *Anabaena* encontram-se na Tabela 3.1.1. *D. pulicaria* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade, seguida, por ordem decrescente, de *D. pulex* e *D. magna*, que apresentaram valores de CEO e CENO iguais.

Tabela 3.1.1. Valores de CEO, CENO e CI_{50} para o efeito do extracto de *Anabaena* na actividade *in vitro* da AChE de *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*. Os intervalos de confiança a 95 % estão indicados entre parênteses.

	CENO (10^{-4}mg/ml)	CEO (10^{-4}mg/ml)	CI_{50} (10^{-4}mg/ml)
D. pulex	5	7,5	16,9 (16,92 - 17,08)
D. pulicaria	< 3,3	3,3	8,5 (8,49 - 8,51)
D. magna	5	7,5	11,6 (8,25 - 16,31)



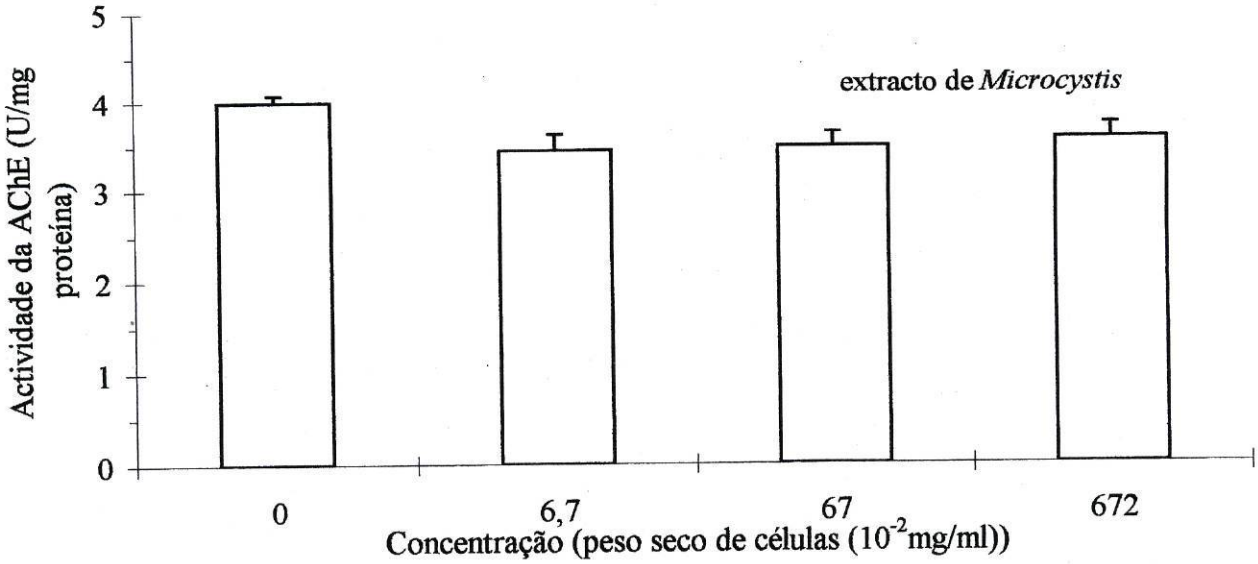
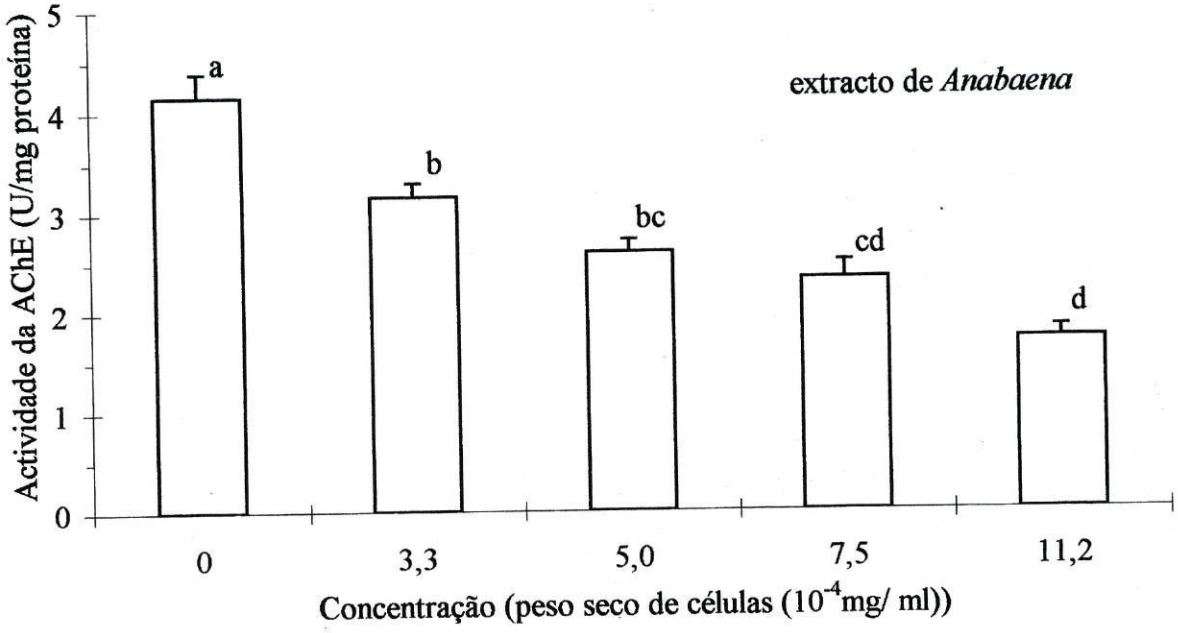


Figura 3.1.1. Actividade *in vitro* da enzima AChE de *D. pulex* incubada com o extracto de *Anabaena* e de *Microcystis*. Os resultados são a média e o erro padrão de doze determinações, efectuadas em três amostras.



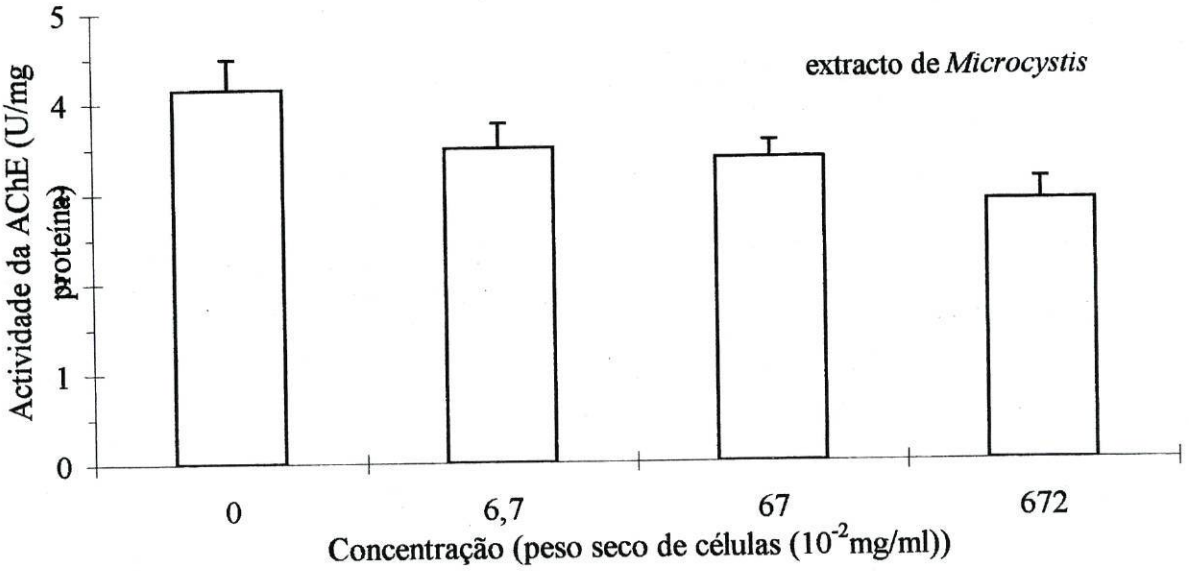
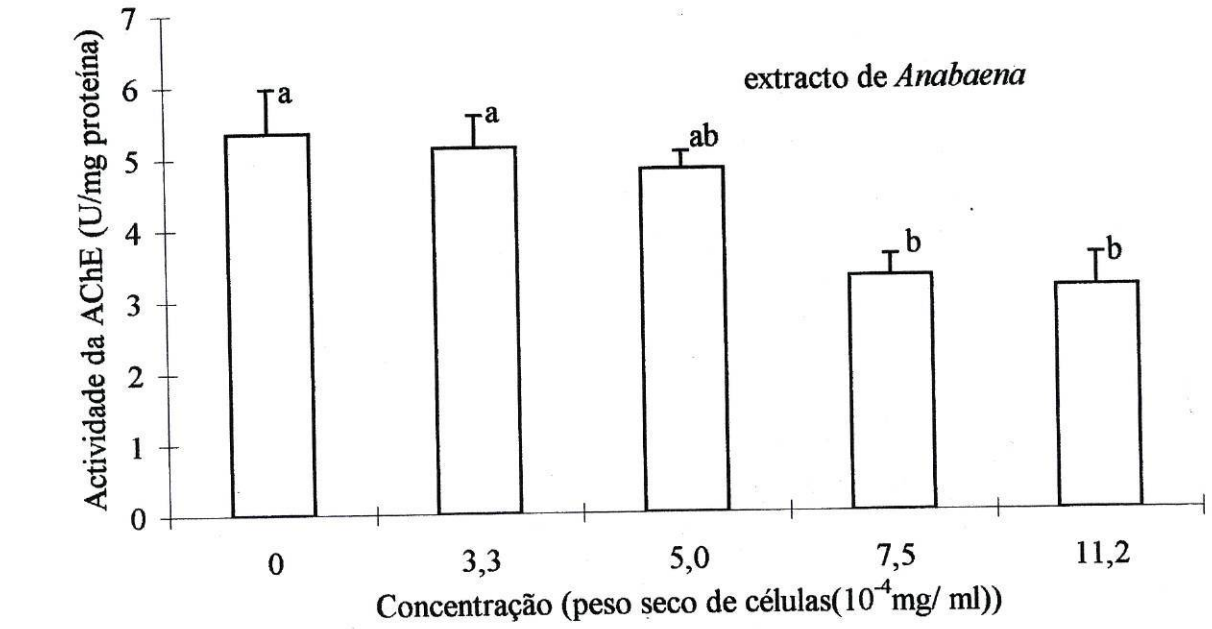


Figura 3.1.2. Actividade *in vitro* da enzima AChE de *D. pulicaria* incubada com o extracto de *Anabaena* e de *Microcystis*. Os resultados são a média e o erro padrão de doze determinações, efectuadas em três amostras.



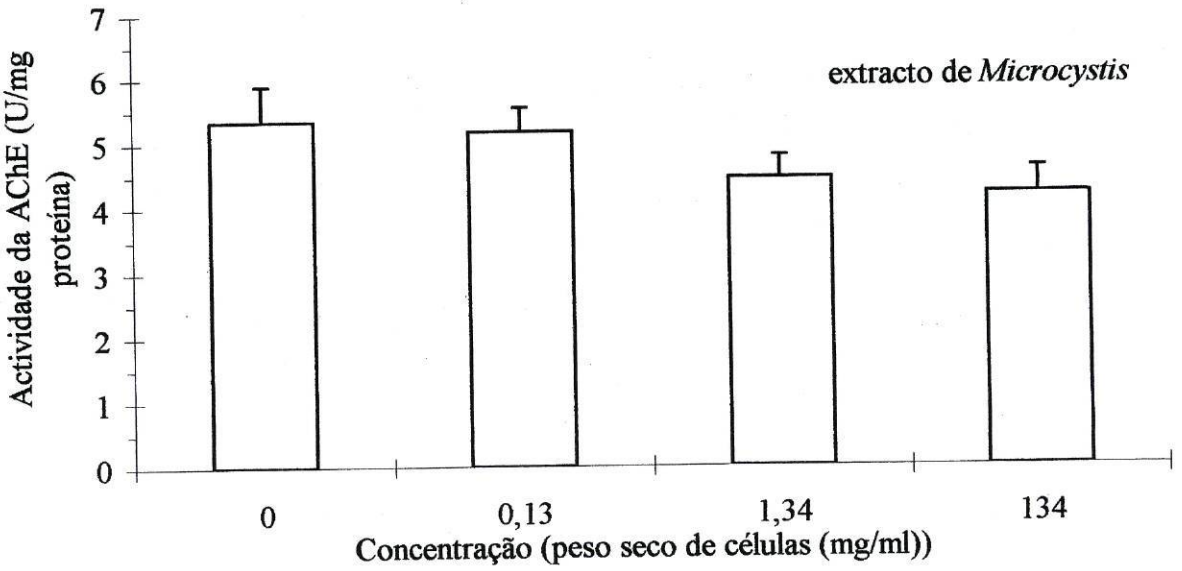


Figura 3.1.3. Actividade *in vitro* da enzima AChE de *D. magna* incubada com o extracto de *Anabaena* e de *Microcystis*. Os resultados são a média e o erro padrão de doze determinações, efectuadas em três amostras.

3.1.5. Discussão

Os valores de actividade da AChE para as três espécies de *Daphnia*, medidos nas amostras controlo, são semelhantes e encontram-se dentro dos valores referidos por Labrot *et al.* (1996) para outros invertebrados (3,24 - 65,91 U/mg de proteína). No entanto, são ligeiramente inferiores ao valor referido por Guilhermino *et al.* (1996a) para juvenis de *D. magna* (8,51 ± 1,331 EP U/mg de proteína). Os níveis de actividade da AChE em *Daphnia* não são constantes, apresentando os indivíduos juvenis níveis enzimáticos mais elevados do que os adultos (Guilhermino *et al.*, 1996b). Esta diferença de actividade da AChE parece estar associada com o início da reprodução. Para além disso, a actividade da AChE determinada em amostras cujo homogeneizado foi centrifugado é inferior à actividade registada em amostras que não sofreram este tratamento, devido à remoção da enzima que se encontra ligada aos fragmentos de *Daphnia* de maiores dimensões e nas células intactas (Guilhermino *et al.*, 1996b). Os ensaios efectuados neste trabalho utilizaram indivíduos adultos, com a primeira postura de ovos recém passada para a câmara de incubação, e durante a preparação dos homogeneizados procedeu-se a uma ligeira centrifugação. Estes dois aspectos em simultâneo devem ter contribuído para a diminuição registada na actividade da enzima, relativamente aos trabalhos referidos, uma vez que a restante metodologia foi semelhante.

Neste trabalho não se observaram diferenças significativas na actividade da AChE incubada com o extracto de *Microcystis*. Efectivamente, de acordo com os conhecimentos actuais, o mecanismo responsável pela toxicidade das microcistinas não está directamente relacionado com a actividade desta enzima. A principal microcistina presente na estirpe de *M. aeruginosa* utilizada neste trabalho é a MCYST-LR que é um potente inibidor das fosfatases proteicas de serina/ treonina do tipo 1 e 2A, quer *in vitro* (MacKintosh *et al.*, 1990) quer *in vivo* (Runnegar *et al.*, 1993). Estas fosfatases são responsáveis pela desfosforilação de proteínas que participam num elevado número de processos celulares (Cohen, 1989). O ligeiro decréscimo, não significativo, da actividade da AChE registado neste trabalho, pode estar relacionado com a presença na estirpe IZANCYA 2 de compostos químicos diferentes das microcistinas (Jungmann, 1992; 1995), que interfiram com a actividade da AChE. Efectivamente, existem agentes químicos, não pesticidas, que influenciam a actividade da AChE, apesar do seu mecanismo de acção ser distinto. Por exemplo, detergentes, metais e misturas complexas de poluentes podem inibir a actividade da AChE (Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998).

A anatoxina-a(s) é um organofosforado natural, que de forma análoga aos insecticidas

organofosforados se liga à AChE e impede que esta degrade a acetilcolina (Carmichael, 1994). Neste trabalho, o extracto de *Anabaena* provocou a redução significativa da actividade da AChE para as três espécies, o que está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores que avaliaram a inibição da AChE da enguia eléctrica na presença da mesma estirpe de *Anabaena* (Mahmood e Carmichael, 1987; Hyde e Carmichael, 1991).

A inibição da actividade da AChE pelo extracto de *Anabaena,* evidenciou ligeiras diferenças de sensibilidade entre as espécies de *Daphnia* estudadas. *D. pulicaria* foi a espécie mais sensível, seguida, por ordem decrescente de sensibilidade, por *D. magna* e *D. pulex*.

D. pulicaria apresentou um valor de CI_{50} ($8{,}5x10^{-4}$ mg/ml) que corresponde a cerca de metade do valor registado para *D. pulex* ($16{,}9x10^{-4}$ mg/ml). Considerando os valores de CENO e CEO, *D. magna* e *D. pulex* apresentaram igual sensibilidade, sendo *D. pulicaria* novamente a espécie mais sensível. Existem diferenças de sensibilidade interespecíficas a organofosforados, que parecem ser consequência de diferentes afinidades de ligação à enzima e de diferentes taxas de fosforilação (Peakall, 1992).

O método físico-químico que utiliza HPLC para detecção da anatoxina-a(s) (Matsunaga *et al.*, 1989), por não ser de fácil execução, não constitui um método adequado de rastreio da toxina (Harada *et al.*, 1999). A inibição da actividade da AChE da enguia eléctrica foi proposta por Mahmood e Carmichael (1987) como método alternativo ao bioensaio com murganhos na detecção de cianobactérias produtoras de neurotoxinas. O ensaio enzimático de inibição da actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia* descrito neste trabalho detectou inibição significativa com o extracto neurotóxico de *Anabaena* mas não com o hepatotóxico de *Microcystis*. Além disso, é de fácil execução, económico, e sendo feito em microplaca, permite o rápido processamento de um grande número de amostras. Adicionalmente, por utilizar invertebrados como organismo teste apresenta vantagens éticas, relativamente aos ensaios com vertebrados. Parece pois poder constituir um método de rastreio da anatoxina-a(s) no meio natural ou em estirpes isoladas. A inibição da actividade da AChE é muito utilizada como biomarcador específico para pesticidas organofosforados e carbamatos, encontrando-se também estudada a sua sensibilidade a outros tipos de agentes ou substâncias químicas (Peakall, 1992; Labrot *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2000). As cianobactérias para além de produzirem várias variantes de uma mesma toxina, podem produzir mais do que um tipo. A estirpe de *A. flos-aquae* utilizada neste trabalho, para além da produção de anatoxina-a(s) produz microcistinas (Harada *et al.*, 1991), cujo mecanismo de toxicidade apesar de não estar directamente implicado na inibição da acetilcolinesterase pode influenciá-lo. O possível efeito de toxinas desconhecidas presentes nas cianobactérias ou de compostos químicos presentes no

meio que possam interferir com a actividade da enzima devem, também, ser considerados.

4. Conclusões

O extracto aquoso feito com as células liofilizadas da estirpe IZANCYA 2 de *M. aeruginosa* é tóxico para as espécies de *Daphnia*, nas fases de ovo, juvenil e adulto, sendo os ovos os mais sensíveis e os adultos os mais resistentes. O desenvolvimento dos ovos pode ser interrompido por contacto directo com o extracto aquoso de *M. aeruginosa*. Desconhece-se, no entanto, se este efeito é devido à acção das microcistinas, de outras substâncias que existam no extracto ou à acção conjunta de ambos os factores. Existem diferenças de sensibilidade entre as espécies *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*, nas fases de ovo, juvenil e adulto. As diferenças interespecíficas na fase de ovo, são menores do que as registadas nas outras duas fases. Este aspecto poderá estar associado à menor diferenciação dos indivíduos nas fases iniciais do seu desenvolvimento.

O extracto aquoso de *M. aeruginosa* interferiu com o desenvolvimento dos ovos, quer os que se encontravam no ovário em fase de formação, quer os da câmara de incubação. Os ovos na câmara de incubação foram afectados de forma directa, uma vez que se encontram separados fisiologicamente da fêmea. O efeito do tóxico foi rápido, dado que a interrupção do desenvolvimento dos ovos ocorreu na fase inicial. As posturas que se encontravam em formação no ovário foram afectadas com menor intensidade, tendo ocorrido o aumento do número de descendentes viáveis e o desenvolvimento dos descendentes inviáveis até um estádio mais avançado nas posturas seguintes. A diminuição do efeito do extracto tóxico pode ser atribuída quer à recuperação gradual da fêmea, quer à diferente localização dos ovos no corpo da fêmea durante o período de exposição. O extracto tóxico interferiu de forma diferente com os ovos que se encontravam nas várias fases do processo de oogénese. As posturas que se encontravam no ovário no início da sua formação foram alteradas quantitativa

e qualitativamente. Ocorreu diminuição do número de ovos produzidos e interrupção do seu desenvolvimento. As posturas que se encontravam na câmara de incubação ou em processo de vitelogénese apresentaram apenas redução na viabilidade dos ovos. Estas diferenças podem ser devidas à acção do tóxico em diferentes processos fisiológicos que ocorrem durante a oogénese.

A exposição ao extracto de *Microcystis,* durante a fase juvenil, provoca diminuição da sobrevivência, atraso no início da reprodução, diminuição no tamanho da fêmea na altura da primeira postura, redução do tamanho da primeira postura e da viabilidade dos juvenis. Os indivíduos expostos nos vários períodos da fase juvenil, apresentaram diferentes sensibilidades ao extracto de *M. aeruginosa*. Os juvenis mais novos foram mais sensíveis do que os mais velhos, o que pode ser devido à ausência nas fases iniciais do período juvenil de mecanismos de desintoxicação eficientes. Na muda, a perda do exoesqueleto associada ao aumento de sensibilidade aos tóxicos que ocorre durante este processo, poderá ainda estar implicado na diferença encontrada. Nos indivíduos expostos durante a parte inicial da fase juvenil, os efeitos negativos foram principalmente ao nível do crescimento e da sobrevivência. Nos organismos que se encontravam na parte final da fase juvenil, o extracto tóxico alterou principalmente a reprodução, em termos quantitativos e qualitativos. Estas diferenças podem estar relacionadas com os processos fisiológicos associados à preparação para a reprodução que têm lugar no fim da fase juvenil.

As células da estirpe IZANCYA 2, fornecidas em simultâneo com *C. vulgaris*, provocaram mortalidade e efeitos negativos na reprodução de *Daphnia*. As células da estirpe hepatotóxica não alteraram a sobrevivência mas interferiram negativamente com a reprodução. Para as duas estirpes, ocorreu atraso do início da reprodução, redução do número de posturas e diminuição da viabilidade dos descendentes. A estirpe hepatotóxica provocou ainda redução do tamanho das posturas. A toxicidade das células intactas foi muito superior à registada para os extractos aquosos, o que pode ser devido à presença de compostos tóxicos, diferentes das microcistinas, que apenas se encontram nas células intactas ou que se degradam durante o processo de preparação dos extractos. Neste ensaio, *D. pulex* foi mais sensível do que *D. pulicaria*, contrariamente ao que aconteceu nos testes efectuados com os extractos aquosos. As diferenças de sensibilidade encontradas entre *D. pulex* e *D. pulicaria* podem dever-se a diferenças de sensibilidade das duas espécies, relativamente a compostos que apenas se encontram nas células intactas ou ao modo de contacto com as toxinas. As toxinas

dissolvidas actuam provavelmente após absorção através da carapaça, enquanto, as células ingeridas são absorvidas através do tubo digestivo. Diferenças no processo de alimentação, que podem estar associadas à filtração, ingestão ou assimilação das células, podem também ser responsáveis pelos resultados encontrados.

No ensaio de inibição da actividade da AChE *in vitro*, efectuado com fêmeas adultas, o extracto de *Anabaena* reduziu significativamente a actividade da enzima para as três espécies, enquanto para o extracto de *Microcystis* não se verificaram diferenças significativas. Este resultado, aliado às vantagens éticas, económicas e de execução laboratorial, que este ensaio apresenta, sugere a sua utilização como método de diagnóstico da presença da anatoxina-a(s).

A estirpe IZANCYA 2 de *M. aeruginosa*, hepatotóxica para mamíferos, é tóxica para os cladóceros *D. pulex*, *D. pulicaria* e *D. magna*. As células da estirpe IZANCYA 4, não tóxica para mamíferos, são tóxicas para os cladóceros, interferindo negativamente com a reprodução. Esta diferença de sensibilidade às cianobactérias, entre mamíferos e cladóceros, faz com que os resultados dos testes de toxicidade efectuados com um dos grupos, não devam ser utilizados para prever os efeitos no outro. Estes resultados sugerem ainda que nos ecossistemas as estirpes tóxicas e não tóxicas interferem com a eficiência da reprodução dos cladóceros.

As concentrações de extracto utilizadas e os valores de CE_{50} para os ovos e de CL_{50} para os juvenis e adultos, correspondem a densidades de células que variam em ordem de grandeza entre 10^7 e 10^8 células por mililitro. Estes valores embora elevados, aproximam-se das densidades de cianobactérias encontradas em massas de água portuguesas (entre $5x10^2$ e 6,9 $x10^7$ cél./ml). Os efeitos da toxicidade do extracto na reprodução e na sobrevivência podem assim ocorrer nas populações de cladóceros do meio natural, quando ocorre a lise e decomposição das células das florescências. De referir ainda que os períodos de exposição a que foram sujeitos os indivíduos foram de curta duração. No meio natural, o período de contacto seria superior, uma vez que as microcistinas sendo muito estáveis e resistentes, podem persistir durante meses.

A fêmea de *D. pulex* que deu origem à população de laboratório utilizada nos testes foi obtida durante uma florescência de *Microcystis*, enquanto a fêmea de *D. pulicaria* foi

recolhida de um lago onde não existe registo da presença de cianobactérias. Nos testes efectuados com os extractos aquosos, *D. pulicaria* foi mais sensível do que *D. pulex*. A diferente sensibilidade exibida por estas duas espécies parece assim ser consequência da diferente selecção imposta pelas condições dos dois ecossistemas. Sabe-se, no entanto, que as condições de cultura podem impor uma forte selecção artificial nos organismos recolhidos do meio natural e resultarem em estirpes laboratoriais não representativas do meio de onde são originárias. O clone de *D. magna*, que neste estudo foi a espécie menos afectada pelas cianobactérias, encontra-se em cultura laboratorial há muitos anos e está por isso privada do contacto com cianobactérias. Está, no entanto, bem adaptado às condições ambientais em que foram efectuados os ensaios e que influenciam a sensibilidade dos organismos. De salientar, ainda, que no teste efectuado com as células intactas, *D. pulex* foi ligeiramente mais sensível do que *D. pulicaria* e a sensibilidade das espécies registada no ensaio de inibição da AChE foi semelhante à encontrada nos testes com extractos. As diferenças de sensibilidade interespecíficas registadas neste trabalho, não podem por isso ser apenas atribuídas a origens diferentes das espécies, devendo também considerar-se a adaptação às condições laboratoriais, a forma de contacto com o tóxico e o estádio do ciclo de vida. De salientar, ainda, que apenas foi utilizado um clone por cada espécie, que pode não ser representativo da sensibilidade da espécie, uma vez que as diferenças intraespecíficas podem, por vezes, ser superiores às interespecíficas.

5. Referências bibliográficas

Adema, D.M.M. 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity test. *Hydrobiol.* 59 (2): 125-134.

Arment, A.R.; Carmichael, W.W. 1996. Evidence that microcystin is a thio-template product. *J. Phycol.* (32): 591-597.

Arnold, D.E. 1971. Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 16 (6): 906-920.

Baird, D.J.; Barber, I.; Bradley, M.; Calow, P.; Soares, A.M.V.M. 1989a. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiol.* 188/189: 403-406.

Baird, D.J.; Barber, I.; Calow, P. 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Func. Ecol.* 4: 399-407.

Baird, D.J.; Barber, I.; Soares, A.M.V.M.; Calow, P. 1991. An early life-stage test with *Daphnia magna* Straus: an alternative to the 21-day chronic test? *Ecotox. Environ. Saf.* 22: 1-7.

Baird, D.J.; Soares, A.M.V.M.; Girling, A.; Barber, I.; Bradley, M.C.; Calow, P. 1989b. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. *In* Lokke, H.; Tyle, H.; Bro-Rasmussen, F. (Eds.). Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology. 17-19 Outubro, Lyngby:144-148.

Barber, I.; Baird, D. J.; Calow, P. 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects. *Func. Ecol.* 4: 409-414.

Barros, P. 1994. Implicações Ecológicas de Cianobactérias em Cladóceros. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra.

Barros, P.; Fidalgo, M.L.; Soares, A.M.V.M. 1995. Zooplâncton da lagoa de Mira. Livro de Resumos do 1º Congresso Ibérico de Plâncton. P3.

Barros, P.; Fidalgo, M.L.; Soares, A.M.V.M. 1998. Estrutura e Dinâmica da Comunidade de Cianobactérias da lagoa de Mira. Livro de Resumos do I Congresso Ibérico de Limnologia, 1 a 6 de Junho de 1998. Universidade de Évora, pp. 123.

Barros, P.; Fidalgo, M.L.; Soares, A.M.V.M. 2000. Parâmetros físico-químicos e dinâmica populacional de *Daphnia* na lagoa do Viriato (Serra da Estrela, Portugal). *In* Conservación de Lagos y Humedales de la Península Ibérica. I. Granados, M. Toro (Eds.): 177-186.

Barros, P.; Fidalgo, M.L.; Soares, A.M.V.M. 1998. Sub-lethal effects of *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna* after an acute exposure. XXVII SIL Congress, Dublin. Agosto, 1998.

Beaton, M.; Hebert, P.D.N. 1994. Patterns of DNA synthesis and mitotic activity during the intermoult of *Daphnia*. *The J. Exp. Zool.* 268: 400-409.

Benndorf, J.; Henning, M. 1989. *Daphnia* and toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in Bautzen Reservoir (GDR). *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* 74 (3): 233-248.

Bishop, C.T.; Anet, E.F.L.J.; Gorham, P.R. 1959. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 453-471.

Boavida, M.J.; Gliwicz, Z.M. 1994. Limnologia de algumas lagoas da serra da Estrela. Livro de Actas do II Seminário Técnico Conservação da Natureza na Serra da Estrela. Guarda.

Boersma, M.; Vijverberg, J. 1994. Resource depression in *Daphnia galeata*, *Daphnia cucullata* and their interspecific hybrid: life history consequences. *J. Plank. Res.* 16(12): 1741-1758.

Boersma, M.; Vijverberg, J. 1995. The significance of nonviable eggs for *Daphnia* populations dynamics. *Limnol. Oceanogr.* 40(7): 1215-1224.

Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.* 7: 3-15.

Botes, D.P.; Tuinman, A.A.; Wessels, P.L.; Viljoen, C.C.; Kruger, H.; Williams, D.H.; Santikarn, S.; Smith, R.J.; Hammond, S.J. 1984. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin* Trans. (1): 2311.

Boué, H.; Chanton, R. 1962. Biologie Animale. Zoologie I. Invertebrés. 2ª ed.. G. Doin & Cie (Ed.). Paris.

Bourne, D.G.; Jones, G.J.; Blakeley, R.L.; Jones, A.; Negri, A.P.; Riddles, P. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11): 4086-4094.

Boyden, C.R. 1974. Trace element content and body size in molluscs. *Nature* 251: 311-314.

Bradford, M. 1976. A rapide and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bradley, M.C.; Baird, D.J.; Calow, P. 1991. Mechanisms of energy allocation to reproduction in the cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Biol. J. Linn. Soc.* 44: 325-333.

Bradley, M.C.; Naylor, C.; Calow, P.; Baird, D.J.; Soares, A.M.V.M. 1993. Reducing variability in *Daphnia* toxicity tests - A case for further standardization. *In* Soares, A.M.V.M.; Calow, P. (Eds.). Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. Lewis Publishers, Boca Raton: 57-70.

Brett, M.T. 1993. Resource quality effects on *Daphnia longispina* offspring fitness. *J. Plank. Res.*: 403-412.

Campbell, D.L.; Lawton, L.A.; Beattie, K.A.; Codd, G.A. 1994. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (Microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Env. Tox. Wat. Qual.* 9: 71-74.

Carbis, C.R.; Mitchell, G.F.; Anderson, J.W.; McCauley, I. 1996. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *J. Fish Diseases* 19: 151-159.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 445-459.

Carmichael, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Sc. Am.* Jan. 64-72.

Carmichael, W.W. 1997. The Cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* 27: 211-256.

Carmichael, W.W.; Beasley, V.; Bunner, D.L.; Eloff, J.N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K-I; Krishnamurthy, T.; Min-Juan, Y.; Moore, R.E.; Rinehart, K.; Runnegar, M.; Skulberg, O.M.; Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26(11): 971-973.

Carmichael, W.W.; Gorham, P.R. 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. *In* Carmichael, W.W. (Ed.), The Water Environment Algal Toxins and Health, Plenium Press, New York: 161-172.

Carvalho, G.R. 1984. Hemoglobin synthesis in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): ecological differentiation between neighbouring populations. *Freshwat. Biol.* 14: 501-506.

Carvalho, G.R.; Hughes, R.N. 1983. The effect of food availability, female culture - density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera). *Freshw. Biol.* 13: 37-46.

Chorus, I.; Bartram, J. (Eds.) 1999. Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London.

Chu, F.S.; Huang, X.; Wei, R.D. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Anal. Chem.* 73(3): 451-456.

Chu, F.S.; Huang, X.; Wei, R.D.; Carmichael, W.W. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystin. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 1928-1933.

Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Ver. Biochem.* 58: 453-508.

Cooney, J.D. 1995. Freshwater tests. *In* Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environment fate and risk assessment: 71-102.

Cousins, I.T.; Bealing, D.J.; James, H.A.; Sutton, A. 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Wat. Res.* 30(2): 481-485.

Cox, E.J.; Naylor, C.; Calow, P. 1992. Frozen algae as food for Daphnia *magna* Straus in toxicity testing. *Ecotox. Environ. Saf.* 24: 58-62.

Craig, M.; McCready, T.L.; Luu, H.A.; Smillie, M.A.; Dubord, P.; Holmes, C.F.B. 1993. Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon* 31: 1541-1549.

Dahlem, A.; Hassan, A.S.; Swanson, S.P.; Carmichael, W.W.; Beasley, V.R. 1989. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Pharmacol. Toxicol.* 64: 177-181.

De Bernardi, R.; Giussani, G. 1990. Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. *Hydrobiol.* 200/201: 29-41.

DeMott, W.R.; Dhawale, S. 1995. Inhibition of *in vitro* protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol.* 134(4): 417-424.

DeMott, W.R.; Zhang, Q.; Carmichael, W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepode and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanog.* 36(7): 1346-1357.

De Robertis, E.; De Robertis, Jr., E. 1987. Cell and molecular biology. 8ª edição. Lea e Febiger.

Duncan, A. 1989. Food limitation and body size in the life cycles of planktonic rotifers and cladocerans. *Hydrobiol.* 186/187: 11-28.

Ebert, D. 1993. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: The influence of genetic, environmental and maternal effects. *Arch. Hydrobiol./Suppl. 90*(4): 453-473.

Elendt, B.; Bias, W.R. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. *Wat. Res.* 24(9): 1157-1167.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, Jr., V.; Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

EPA 1989. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Environmental Protection Agency, EPA/600/4/001 1989.

Eriksson, J.E.; Meriluoto, J.A.O.; Jujari, H.P.; Jamel, Al-Layl, K.; Codd, G.A. 1988. Cellular effects of cyanobacterial peptide toxins. *Toxicity Assessment* 3: 511-517.

Eriksson, J.; Meriluoto, J.; Lindholm, T. 1986. Can cyanobacterial peptide toxins accumulate in aquatic food chains? Proc. IV, ISME: 655-658.

Eriksson, J.E.; Meriluoto, J.A.O.; Lindholm T. 1989. Accumulatiuon of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiol.* 183: 211-216.

Eriksson, J.E.; Toivola, D.; Meriluoto, J.A.O.; Karaki, H.; Han, Y-G; Hartshorne, D. 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophysical Res. Communications* 173(3): 1347-1353.

Esslova, M. 1959. Embryonic development of parthenogenetic eggs of *Daphnia pulex*. *Acta Soc. Zool. Bohemoslov* 23(1): 81-87.

Falconer, I.R. 1993. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. *In* Algal Toxins in Seafood and Drinking Water: 165-175.

Fastner, J.; Flieger, I.; Neumann, U. 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. *Wat. Res.* 32(10): 3177-3181.

Fastner, J.; Heinze, R.; Chorus, I. 1995. Microcystin-content, hepatotoxicity and citotoxicity of cyanobacteria in some German water bodies. *Wat. Sci. Tech.* 32(4): 165-170.

Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

Forsteath, N. 1992. Management systems for intensive fin fish aquaculture. *In* Fin Fish Workshop: Refresher Course for Veterinarians, Proceedings 182: 49-56. Post Graduate Committee in Veterinary Science, Univ. Sydney.

Forsyth, D.J.; Haney, J.; James, M.R. 1992. Direct observation of toxic effects of cyanobacterial extracellular products on *Daphnia*. *Hydrobiol.* 228: 151-155.

Fox, H.M.; Phear, E.A. 1953. Factors influencing hemoglobin synthesis by *Daphnia magna*. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 145: 179-189.

Francis, G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.

Fulton III, R.S.; Jones, R.C. 1991. Growth and reproductive responses of *Daphnia* to cyanobacterial blooms on the Potomac river. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 76 (1): 5-19.

Fulton III, R.S.; Paerl, H. 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *J. Plankton Res.* 9(5): 837-855.

Fulton, R.S., III. 1988a. Grazing on filamentous algae by herbivorous zooplankton. *Freshw. Biol.* 20: 263-271.

Fulton, R.S., III 1988b. Resistance to blue-green algal toxins by *Bosmina longirostris*. *J. Plank. Res.* 10: 771-778

Garcia, L.M.; Castro, B.; Ribeiro, R.; Guilhermino, L. 2000. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers* 5: 274-284.

Giesy, J.P.; Graney, R.L. 1989. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiol.*188/189: 21-60.

Gilbert, J.J. 1990. Differential effects of *Anabaena affinis* on cladoceran and rotifers: mechanisms and implications. *Ecol.* 71(5): 1727-1740.

Gliwicz, Z.M. 1969. Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophy. *Ekol. Pol.* 17(36): 663-708.

Gliwicz, Z.M. 1977. Food size selection and seasonal succession of filter feeding zooplankton in an eutrophic lake. *Ekol. Pol.* 25(2): 179-225.

Goarant, E. 1994. Specific immunological probes for the identification and tracing of prey in crustacean gut contents. The example of cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol.*131(2): 243-252.

Goldberg, J.; Huang, H.B.; Kwon, Y.G.; Greengard, P.; Nairn, A.C.; Kuriyan, J. 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376: 745-753.

Goulden, C.E.; Hornig, L.H. 1980. Population oscillations and energy reserves in planktonic cladocera and their consequences to competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (3): 1716-1720.

Green, J. 1956. Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustacea: Cladocera).*Proc. Zool. Soc. London* 126: 173-204.

Guilhermino, L. 1996. Modelos e Sistemas de Avaliação da Toxicidade de Substâncias Tóxicas. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra.

Guilhermino, L.; Barros, P.; Silva, M.C.; Soares, A.M.V.M. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3(2): 157-163.

Guilhermino, L.; Diamantino, T.C.; Ribeiro, R.; Gonçalves, F.; Soares, A.M.V.M. 1997. Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. Environ. Saf.* 38: 292-295.

Guilhermino, L.; Lopes, M.C.; Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M. 1996a. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*.*Chemosphere* 32(4): 727-738.

Guilhermino, L.; Lopes, M.C.; Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M. 1996b. Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 57: 979-985.

Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2): 79-99.

Hamza, W.; Bonacina, C.; Canale, C. 1998. Side effects of water liming on body size and eggs development of *Daphnia* species in Lake Orta (N. Italy). *Hydrobiol.* 368: 129-136.

Hanazato, T. 1995. Toxic cyanobacteria and the zooplankton community. *In* Toxic *Microcystis*. Watanabe, M.F.; Harada, K.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Eds.). CRC Press: 79-101.

Hanazato, T. 1996. Combined effects of food shortage and oxygen deficiency on life history characteristics and filter screens of *Daphnia*. J. Plank. Res. 18(5): 757-765.

Hanazato, T.; Yasuno, M. 1984. Growth, reproduction and assimilation of *Moina macrocopa* fed on *Microcystis* and/or *Chlorella*. *Jap. J. Ecol.* 34: 195-202.

Hanazato, T.; Yasuno, M. 1987. Evaluation of *Microcystis aeruginosa* as food for zooplankton in a eutrophic lake. *Hydrobiol.* 144: 251-259.

Haney, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand J. Mar. Fresh Res.* 21: 467-475.

Harada, K.-I.; Kondo, F.; Lawton, L. 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In* Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus e J. Bartram (Eds). E &FN Spon, Londres.

Harada, K.I.; Ogawa, K.; Kimura, Y.; Murata, H.; Suzuki, M.; Thorn, P.M.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W. 1991. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 535-540

Harada, K-I; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M.F.; Itezono, Y.; Nakayama, N. 1990. Structural determination of geometrical isomers of microcystins-LR and RR from cyanobacteria by two dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 473-481.

Hawkins, P.R.; Chandrasena, N.R.; Jones, G.J.; Humpage, A.R.; Falconer, I.R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35(3): 341-346.

Hawkins, P.R.; Runnegar, M.T.C.; Jackson, A.R.B.; Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (Blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Suba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1292-1295.

Henriksen, P.; Carmichael, W.W.; An, J.; Moestrup, O. 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35(6): 901-913.

Hietala, J. 1996. Life history responses of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Helsínquia, Finlândia.

Hietala, J.; Laurén-Määttä, C.; Walls, M. 1996. Sensitivity of *Daphnia* to toxic cyanobacteria: effects of genotype and temperature. *In* Hietala, J. 1996. Life history responses of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Helsínquia, Finlândia

Hietala, J.; Laurén-Määttä, C.; Walls, M. 1997. Life history responses of *Daphnia* clones to toxic *Microcystis* at different food levels. *J. Plank. Res.* 19(7): 917-926.

Hietala, J.; Reinikainen, M.; Walls, M. 1995. Variation in life history responses of *Daphnia* to toxic *Microcystis aeruginosa*. *J. Plank. Res.* 17(12): 2307-2318.

Hoffman, W.S. 1970. Water and electrolytes. *In* The Biochemistry of Clinical Medicine. Year BooK Medical Publishers, Chicago, IL: 209-293.

Holm, N.P.; Ganf, G.G.; Shapiro, J. 1983. Feeding and assimilation rates of *Daphnia pulex* fed *Aphanizomenon flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* 28 (4): 677-687.

Holm, N.P.; Shapiro, J. 1984. An examination of lipid reserves and the nutritional status of *Daphnia pulex* fed *Aphanizomenon flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* 29 (5): 1137-1140.

Honkanen, R.E.; Zwiller, J.; Moore, R.E.; Daily, S.L.; Khatra, B.S.; Dukelow, M.; Boynton, A.L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The J. Biol. Chem.* 256 (32): 19401-19404.

Humpage, A.R.; Falconer, I.R. 1999. Microcystin-LR and liver tumor promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. (s.n.) 61-75.

Hyde, E.G.; Carmichael, W.W. 1991. Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is na irreversible active site - directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *J. Biochem. Toxicol.* 6(3): s.n.

Ikawa, M.; Haney, J.F.; Sasner, J.J. 1996. Inhibition of *Chlorella* growth by the lipids of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Hydrobiol.* 331: 167-170.

Ikawa, M.; Sasner, J.J.; Haney, J.F. 1994. Lipids of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* and inhibition of *Chlorella* growth. *J. Chem. Ecol.* 20: 2429-2436.

Infante, A.; Abella, S.E.B. 1985. Inhibition of *Daphnia* by *Oscillatoria* in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* 30 (5): 1046-1052.

Infante, A.; Riehl, W. 1984. The effect of Cyanophyta upon zooplankton in a eutrophic tropical lake (Lake Valencia, Venezuela). *Hydrobiol.*113: 293-298.

Ingebritsen, T.S.; Cohen, P. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338.

Jackson, A.R.B.; McInnes, A.; Falconer, I.; Runnegar, M.T.C. 1984. Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Vet. Pathol.* 21: 102-113.

Jones, G.J.; Orr, P.T. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.* 28 (4): 871-876.

Jungmann, D. 1992. Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnol. Oceanogr.* 37 (8): 1777-1783.

Jungmann, D. 1995. Isolation, purification, and characterization of new *Daphnia*-Toxic compound from axenic *Microcystis flos-aquae* strain PCC7806. *J. Chem. Ecol.* 21(11): 1665-1676.

Jungmann, D.; Benndorf, J. 1994. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp. and the role of microcystins. *Freshw. Biol.* 32: 13-20.

Jungmann, D.; Henning, M.; Jüttner, F. 1991. Are the some compounds in *Microcystis* responsible for toxicity to *Daphnia* and inhibition of its filtering rate? *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 76 (1): 47-56.

Kirpenko, Y.A.; Sirenko, L.A.; Kirpenko, N.I. 1981. Some aspects concerning remote after-effects of blue-green algae toxin impact on warm-blooded animals. *In* Carmichael, W.W. (Ed.), The Water Environment Algal Toxins and Health, Plenium Press, New York.

Kiviranta, J.; Sivonen, K.; Lahti, K.; Luukkainen, R.; Niemäla, S.I. 1991a. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins - a laboratory study. *Arch. Hydrobiol.*121(3): 281-294.

Kiviranta, J.; Sivonen, K.; Niemela, S.I. 1991b. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 423-436.

Klaassen, C.D.; Amdur, M.O.; Doull, J. 1996. Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of poisons. 5ª ed. McGraw Hill, New York.

Klapes, N.A. 1990. Acute toxicity of the natural algicide, cyanobacterin to *Daphnia magna*. *Ecotox. Env. Saf.* 20: 167-174.

Kobayashi, M.; Hayakawa, F.; Ninomiya, M. 1987. Hatchability and hemoglobin of *Daphnia* embryo. *Physiol. Zool.* 60: 507-512.

Kobayashi, M.; Hoshi, T. 1984. Analysis of respiratory role of haemoglobin in *Daphnia magna*. *Zool. Sci.* 1: 523-532.

Kobayashi, M.; Takahashi, Y. 1994. *In vivo* oxigenation of hemoglobin in early embryos of *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107 A(1): 127-131.

Kobayashi, T. 1992. A study of physicochemical conditions, phytoplankton and microcrustacean zooplankton in Wallerawang Reservoir, New South Wales. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 113 (1): 27-41.

Koivisto, S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ. Pollution* 90 (2): 263-267.

Koivisto, S.; Ketola, M.; Walls, M. 1992. Comparison of five cladoceran species in short and long term copper exposure. *Hydrobiol.* 248: 125-136

Konst, H.; Mckercher, P.D.; Gorham, P.R.; Robertson, A.; Howell, J. 1965. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Can. J. Comp. Med. Vet.* 29: 221-228.

Kotai, J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegien Inst. Wat. Res.* 11/69. Blidern. Oslo: 5.

Kotak, B.G.; Zuraweel, R.W.; Prepas, E.E. 199?. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartements. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* s.n.

Krantzberg, G. 1989. Metal accumulation by chironomid larvae: the effects of age and body weight on metal body burdens. *Hydrobiol.* 188/189: 497-506

Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I; Fitzgerald, J 1999a. Human health aspects. *In* Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus e J. Bartram (Eds). E &FN Spon, Londres.

Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I.; Fitzgerald, J. 1999b. Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and managemen. *In* Chorus, I.; Bartram, J. (Eds.).E & FN Spon, London, New York, pp: 113-153

Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M.M.; Takahagh, H.; Kakisawa, H. 1987. Cyanoviridin-RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. *Tetrahed. Lett.* (28): 4695.

Labrot, F.; Ribera, D.; Saint Denis, M.; Narbonne, J.F. 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidases activity in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1: 21-28.

Lagadic, L.; Caquet, T.; Ramade, F. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrates populations and communities. *Ecotox.* 3: 193-208.

Lampert, W. 1977. Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* De Geer as related to environmental conditions. II. The dependence of carbon assimilation on animal size, temperature, food concentration and diet species. *Arch. Hydrobiol.* Suppl. 48: 310-335.

Lampert, W. 1981a. Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on *Daphnia*. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 66 (3): 285-298.

Lampert, W. 1981b. Toxicity of the blue-green *Microcystis aeruginosa*: effective defence mechanism against grazing pressure by *Daphnia*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1436-1440.

Lampert, W. 1982. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. *Arch. Hydrobiol.* 95 (1/4): 207-220.

Laurén-Määttä, C.; Hietala,J.; Walls, M. 1996. Population dynamics of *Daphnia pulex* in microcosms with toxic cyanobacteria. *In* Hietala, J. 1996. Life history responses of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Helsínquia, Finlândia.

LeBlanc, G.A.; Surprenant, D.C. 1984. The influence of mineral salts on fecundity of the water flea (*Daphnia magna*) and the implications on toxicity testing of industrial wastewater. *Hydrobiol.* 108: 25-31.

Lee, C.M.; Turner, C.A.; Huntington, E. 1986. Factors affecting the culture of *Daphnia magna*. *In* Poston, T.M.; Purdy, R. (Eds.). Aquatic Toxicology and Environnmental Fate, vol. 19. ASTM STP 291, American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 357-368.

Lee, D.R.; Buikema Jr., A.L. 1979. Molt-related sensitivity of *Daphnia pulex* in toxicity testing. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 1129-1133.

Lei, C.-H.; Clifford, H.F. 1974. Field and laboratory studies of *Daphnia schodleri* Sars from a Winterkill Lake of Alberta. *Natl. Mus. Nat. Can. Publ. Zool.* 9: 1-53.

Lin, J.; Chu, F.S. 1994. Kinetics of distribution of microcystin-LR in serum and liver cytosol of mice: na immunochemical analysis. *J. Agric. Food Chem.* 42(4): 1035-1040.

Liras, V.; Lindberg, M.; Nyström, P.; Annadotter, H.; Lawton, L.; Graf, B. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshw. Biol.* 39: 233-242.

Machácek, J. 1995. Inducibility of life history changes by fish kairomone in various developmental stages of *Daphnia*. *J. Plank. Res.* 17 (7): 1513-1520.

Mackintosh, C.; Beattie, K.A.; Klumpp, S.; Cohen, P.; Codd, G. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Febs Letters* 264 (2): 187-192.

Mahmood, N.A.; Carmichael, W.W. 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 25(11): 1221-1227.

Mata, L. 1992. Vesículas e vacúolos nos caminhos da endocitose. *In* Biologia Celular. C. Azevedo (Coord.), Fundação Gomes Teixeira (Ed.). 215-223.

Matsunaga, S.; Moore, R.E.; Niemczura, W.P.; Carmichael, W.W. 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Amer. Chem. Soc.* 111: 8021-8023.

McDermott, C.M.; Nho, C.W.; Howard, W.; Holton, B. 1998. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 36(12): 1281-1996.

Meriluoto, J.A.; Eriksson, J.E. 1988. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. *Chrom.* 20(223): 93-99.

Miralto, A.; Ianora, A; Poulet, S.A. 1995. Food type induces different reproductive responses in the copepod *Centropages typicus*. *J. Plank. Res.* 17(7): 1521-1534.

Moreno-Garrido, I.; Lubián, L.M.; Soares, A.M.V.M. 1999. *In vitro* populations of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller demonstrate inhibition when fed with copper-preaccumulating microalgae. *Ecotox. Environm. Saf.* 44: 220-225.

Namikoshi, M.; Rinehart, K.L. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Industrial Microbiol.* 17: 373-384.

Nauwerck, A. 1960. Zur systematik und Ökologie portugiesischer planktonalgen. *Bol. Soc. Brot.* XI: 7-56.

Naylor, C.; Bradley, M.C.; Calow, P. 1992. Effect of algal ration-quality and method of quantification on growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Arch. Hydrobiol.* 1-11.

Nizan, S.; Dimentman, C.; Shilo, M. 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.* 31 (3): 497-502.

Nogueira, I. 1999. Efeitos ecotoxicológicos de *Microcystis* em *Daphnia pulex*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto.

Obreshkove, V.; fraser, A.W. 1940. Growth and diferentiation of *Daphnia magna* eggs *in vitro*. *Biol. Bull.* 78: 426-436.

OECD 1993. Draft OECD guideline 202 part II, *Daphnia* reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development 6/93.

Ohta, T.; Tokishita, S.; Shiga, Y.; Hanazato, T.; Yamagata, H. 1998. An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Env. Res.* A 77: 43-48.

Oliveira, M.R.L. 1991. Eutrofização do rio Guadiana. "Blooms" de Cyanophyceae e influência na ictiofauna. Rel. Téc. Cientif. INIP. Lisboa.

Onodera, H.; Oshima, Y.; Henriksen, P.; Yasumoto, T. 1997. Confirmation of anatoxin-a(s)in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 35: 1645-1648.

Parejko, K.; Dodson, S. 1990. Progress towards characterization of a predator/prey kairomone: *Daphnia pulex* and *Chaoborus americanus*. *Hydrobiol.* 198: 51-59.

Patterson, G.M.L.; Larsen, L.K.; Moore, R.E. 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* 6: 151-157.

Paul, R.J.; Pirow, R. 1997/98. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology* 100: 298-306.

Payne, J.F.; Mathieu, A.; Melvin, W.; Fancey, L.L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban riversand a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull* 32: 225-231.

Peakall, D. 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, Londres.

Penãloza, R.; Rojas, M.; Vila, I.; Zambrano, F. 1990. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. *Freshw. Biol.* 24: 233-240.

Peters, R.H. 1987. Metabolism in *Daphnia*. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 45: 193-243.

Pflugmacher, S.; Codd, G.A.; Steinberg, C.E.W. 1999. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. s.n.: 111-115.

Porter, K.G. 1973. Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton. *Nature* 244: 179-180.

Porter, K.G.; Mc Donough, R. 1984. The energetic cost of response to blue-green algal filaments by cladocerans. *Limnol. Oceanogr.* 29 (2): 365-369.

Porter, K.G.; Orcutt, J.D. Jr. 1980. Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for *Daphnia*. *Evol. Ecol. Zooplank. Commun.*: 268-281.

Pratt, R.; Oneto, J.F.; Pratt, J. 1945. Studies on *Chlorella vulgaris*. X. Influence of the age of the culture on the accumulation of chlorellin. *Amer. J. Bot.* 32: 405-408.

Prepas, E.E.; Kotak, B.G.; Campbell, L.M.; Evans, J.C.; Hrudey, S.E.; Holmes, C.F.B. 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 41-46.

Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. 1984. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, Washington.

Raziuddin, S.; Siegelman, H.W. E Tornabene, T.G. 1983. Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* . Eur. J. Biochem. 137: 333-336.

Reinikainen, M.; Hietala, J.; Walls, M. 1999. Reproductive allocation in *Daphnia* exposed to toxic cyanobacteria. *J. Plank. Res.* 19(7): 917-926.

Reinikainen, M.; Hietala, J.; Walls, M. 1998. Adaptations and resistance of zooplankton to stress: effects of genetic, environmental, and physiological factors. *Ecotox. Env. Saf.* 40: 77-80.

Reinikainen, M.; Ketola, M.; Jantunen, M.; Walls, M. 1995a. Effects of *Microcystis aeruginosa* exposure and nutritional status on the reproduction of *Daphnia pulex*. *J. Plank. Res.* 17(2): 431-436.

Reinikainen, M.; Ketola, M.; Walls, M. 1994. Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnol. Oceanogr.* 39(2): 424-432.

Reinikainen, M.; Kiviranta, J.; Ulvi V.; Niku-Paavola M. 1995b. Acute toxic effects of a novel cyanobacterial toxin on the crustaceans *Artemia salina* and *Daphnia pulex*. *Arch. Hydrobiol.* 133 (1): 61-69.

Repka, S. 1996. Inter and intraspecific differences in *Daphnia* life histories in response to two food sources: the green alga *Scenedesmus* and the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria*. *J. Plank. Res.* 18(7): 1213-1223.

Repka, S. 1997. Effects of food type on the life history of *Daphnia* clones from lakes differing in trophic state. I. *Daphnia galeata* feeding on *Scenedesmus* and *Oscillatoria*. *Freshwater Biology* 37: 675-683.

Repka, S. 1998. The effects of food quantity and food quality on *Daphnia*: morphology of feeding structures and life history. Tese de Doutoramento, Universidade de Amesterdão.

Repka, S.; van der Vlies, M.; Vijverberg, J. 1998. Food quality of detritus derived from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria limnetica* for *Daphnia galeata*. *J. Plank. Res.* 20(11): 2199-2205.

Ressom, R.; Soong, F.S.; Fiztgerald, J.; Turczynowicz, L.; El Saadi, O.; Roder, D.; Maynard, T.; Falconer, I. 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). Nat. Health and Med. Council, The Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia, 108pp.

Rinehart, K.L.; Namikoshi, M.; Choi, B.W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6: 159-176.

Rohrlack, T.; Dittmann, E.; Henning, M.; Börner, T.; Kohl, J. 1999a. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Env. Microbiol.* 65(2): 737-739.

Rohrlack, T.; Henning, M.; Kohl, J. 1999b. Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata* ingestion rate. *J. Plank. Res.* 21(8): 1489-1500.

Rossi, F. 1980. Comparative observations on the female reproductive system and parthenogenetic oogenesis in Cladocera. *Boll. Zool.* 47: 21-38.

Runnegar, M.T.C.; Falconer, I.R. 1982. The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *South African J. Sci.* 78.

Runnegar, M.T.C.; Kong, S.M.; Berndt, N. 1993. Protein phosphatase inhibition and *in vivo* hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265 (2): G224-G230.

Runnegar, M.T.C.; Kong, S.M.; Zhong, Y.Z.; Ge, J.L.; Lu, S.C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 235-241.

Runnegar, M.T.C.; Kong, S.M.; Zhong, Y.Z.; Lu, S.C. 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49(2): 219-225.

Ruppert, E.E.; Barnes, R.D. 1994. Invertebrate Zoology. 6ª edição. Saunders College Publishing.

Sartonov, A. 1995. Effects of *Microcystis aeruginosa* on interference competition between *Daphnia pulex* and *Keratella cochlearis*. *Hydrobiol.* 307: 117-126.

Sbiyyaa, B.; Oudra, M.; Loudiki, M.; Bouguerne, A.; Tifnouti, A. 1998. Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* KÜTZ. to three cladocerans species. Harmful Algae, Reguera, B., Blanco, J.; Fernández, M.L.; Wyatt, T. Xunta de Galicia and Intergover: 382-385.

Scholtissek, B.; Jürgens, U.J.; Weckesser, J. 1991. Purification and electrophoretic pattern of the lipopolysaccharide of *Microcystis* sp. PCC 7806. *Arch. Hydrobiol./Suppl. 92, Algological Studies* 64: 361-368.

Shi, L.; Carmichael, W.W.; Miller, I. 1994. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch. Microbiol. s.n.*

Sivonen, K.; Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. *In* Chorus, I.; Bartram, J. (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, New York.

Skulberg, O.M.; Carmichael, W.W.; Codd, G.A.; Skulberg, R. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). *In* Algal Toxins in Seafood and Drinking Water: 145-164.

Skulberg, O.M.; Codd, G.A.; Carmichael, W.W. 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio* 13(4): 244-247.

Smayda, T.J. 1997. What is a bloom? *Limnol. Oceanogr.* 42(5): 1132-1136.

Snell, T.W. 1980. Blue-green algae and selection in Rotifer population. *Oecologia (Berlin).* 46: 343-346.

Soares, A.M.V.M. 1989. Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for Ecotoxicology. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Sheffield.

Soares, A.M.V.M.; Baird, D.J.; Barber, I.; Bradley, M.; Calow, P. 1991. Variation in chronic stress-tolerance among artificial clone-populations of *Daphnia magna* Straus: An ecophysiological study. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 23-26.

Soares, A.M.V.M.; Baird, D.J.; Calow, P. 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Env. Tox. Chem.* 11: 1477-1483.

Soares, A.M.V.M.; Calow, P. 1993. Seeking standardization in Ecotoxicology. *In* Soares, A.M.V.M.; Calow, P. (Eds.). Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. Lewis Publishers, Boca Raton, pp: 1-6.

Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, London.

Stross, R.G. 1969. Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. II. Induction of winter diapause in the artic. *Biol. Bull.* 136: 264-273.

Stross, R.G. 1971. Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. IV.Light and CO_2-sensitive phases within the cycle of activation. *Biol. Bull.* 140: 137-155.

Takahashi, I.T.; Cowgill, U.M.; Murphy, P.G. 1987. Comparison of ethanol toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* tested at two different temperatures: static acute toxicity test results. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 229-236

Taylor, G.; Baird, D.J.; Soares, A.M.V.M. 1998. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environm. Toxicol. Chem.* 17(3): 412-419.

Terao, K.; Ohmori, S.; Igarashi, K.; Ohtani; I.; Watanabe, M.; Harada, K.-I.; Ito, E.; Watanabe, M. 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32: 833-843.

Tessier, A.J.; Goulden, C.E. 1982. Estimating food limitation in cladoceran populations. *Limnol. Oceanogr.* 27 (4): 707-717.

Theiss, W.C.; Carmichael, W.W.; Wyman, J.; Bruner, R. 1988. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon* 26 (7): 603-613.

Threlkeld, S.T. 1987. *Daphnia* life history strategies and resource allocation patterns. *Mem. Inst. Ital. Idrobiol.* 45: 353-366.

Utkilen, H.; Gjolme, N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4): 1321-1325.

Valente, A.; Formigo, N.; Maia, C. 1994. A Ictiofauna das lagoas do parque natural da Serra da Estrela. Livro de actas do II Seminário Técnico Conservação da Natureza. Guarda.

Vasconcelos, V. 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. *Arch. Hydrobiol.*130(4): 439-451.

Vasconcelos, V.M. 1995a. Toxicologia de cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto.

Vasconcelos, V.M. 1995b. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicol.* 32: 227-237.

Vasconcelos, V.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Namikoshi, M. 1993. Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis* (Cyanobacteria) waterbloom collected in the drinking water reservoir for Porto, Portugal. *J. Environ. Sci. Health* A 28(9): 2081-2094.

Vasconcelos, V.M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Namikoshi, W.R. 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend Elekin. *Arch. Hydrobiol.* 134(3): 295-305.

Vasconcelos, V.M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Namikoshi, M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Wat. Res.* 30: 2377-2384.

Vijverberg, J. 1996. Decrease in *Daphnia* egg viability at elevated pH. *Limnol. Oceanogr.* 41: 789-794.

Watanabe, M.; Harada, K.; Matsuura K.; Watanabe, M.; Suzuki, M. 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 1: 161-165.

Watanabe, M.F.; Oishi, S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1342-1344.

Watanabe, M.M.; Kaya, K.; Takamura, N. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.* 28: 761-767.

Weckesser, J.; Drews, G. 1979. Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 215-239.

Weckesser, J.; Martin, C. 1990. Toxine aus Cyanobakterien im wasser: Microcystin und verwandte peptide. *Forum Microbiol.* 7-8: 364-369.

Welker, M.; Steinberg, C. 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Wat. Res.* 33(5): 1159-1164.

Wetzel, R.G. 1993. Limnologia. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Wickstrom, M.L.; Khan, S.A.; Haschek, W.M.; Wyman, J.F.; Eriksson, J.E.; Schaeffer, D.J.; Beasley, V.R. 1995. Alterations in microtubules, intermediate filaments and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol. Pathol.* 23: 326-337.

Winner, R.W.; Farrell, M.P. 1976. Acute and chronic toxicity to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33: 1685-1691.

Yasuno, M.; Sugaya, Y. 1991. Toxicities of *Microcystis viridis* and the isolated hepatotoxic polypeptides on cladocerans. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 2622-2626.

Yasuno, M.; Sugaya, Y.; Kaya, K.; Watanabe, M. 1998. Variations in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*. *Phycol. Res.* 46: 31-36.

Zaffagnini, F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. *Mem. Inst. Ital. Idrobiol.* 45: 245-284.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. 3ª ed.. Prentice-Hall International, New Jersey.