

UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS



**ISOLAMENTO, CULTURA E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE ESTIRPES
DE CIANOBACTÉRIAS DA LAGOA DE MIRA**

Carla Maria Teixeira Garcia

PORTO 2001

Carla Maria Teixeira Garcia

**ISOLAMENTO, CULTURA E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE ESTIRPES
DE CIANOBACTÉRIAS DA LAGOA DE MIRA**

Dissertação de Mestrado em Hidrobiologia apresentada
à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Ao Exmo. Sr. Prof. Dr. Vitor Vasconcelos, meu orientador, todo o apoio e disponibilidade demonstrados ao longo deste trabalho, assim como todas as sugestões feitas, para melhoria deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, Martin, Joana, Rosário, Isabel, por todas as indicações e compreensão demonstradas, durante a execução prática deste trabalho.

À Elisa por toda a ajuda e apoio na elaboração dos testes.

À Dra. Manuela.

Ao Óscar por toda a ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho.

Aos meus pais, que me conduziram.

Aos meus irmãos, especialmente ao Gusto pelos esclarecimentos sobre o funcionamento da língua portuguesa.

Ao Zé, meu marido, todo o precioso apoio informático e compreensão nos momentos mais difíceis.

A todos vós dedico este trabalho.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são muitas vezes locais de grande risco para a saúde de vários organismos incluindo o Homem, uma vez que determinadas cianobactérias têm a capacidade de produzir toxinas. As cianotoxinas são diversas e podem gerar sintomas graves nos organismos. As toxinas estudadas neste trabalho, microcistinas, são consideradas como hepatotoxinas, a sua toxicidade exerce-se fundamentalmente ao nível hepático. Estas microcistinas são causadoras de certas intoxicações, podendo originar a morte. O contacto com microcistinas pode dar-se por consumo directo de águas contaminadas, pela ingestão de organismos bioacumuladores (moluscos bivalves), ou ainda pelo contacto superficial em actividades de recreio aquático. A morte ocorre sempre devido a choque hipovolémico, devido a uma hemorragia hepática, provocada pela destruição dos hepatócitos.

Considerando que a maior parte dos ecossistemas de água doce revelam a presença de microcistinas, incluindo ecossistemas utilizados como fonte de água para consumo humano, é de grande importância conhecer-se o comportamento destes microrganismos, por forma a implantar medidas de segurança que passem pela monitorização das reservas de água doce, tão escassas e tão importantes.

O local de estudo de microcistinas deste trabalho foi a Lagoa de Mira : um ecossistema de água doce eutrofizado, onde estudos anteriores têm revelado a presença de algumas espécies de cianobactérias tóxicas como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*, e determinado a sua toxicidade.

Neste trabalho, procurou-se fazer o isolamento e cultura de estirpes de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa de Mira, a quantificação e avaliação da diversidade de microcistinas por HPLC e ELISA, e a detecção de possíveis diferenças quer em termos quantitativos, quer do perfil de microcistinas. A colheita das cianobactérias foi efectuada por arrasto, nos meses de Março e Maio de 2000, e as estirpes foram isoladas em laboratório.

Os resultados obtidos permitiram verificar a existência de uma só espécie bacteriana que foi *Microcystis aeruginosa*. Foram quantificadas dez microcistinas não identificadas e identificada e quantificada MCYST - LR em sete estirpes.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. GENERALIDADES	1
1.2. DINÂMICA DE MICROCYSTIS EM ECOSISTEMAS TEMPERADOS.....	3
1.3. TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS.....	4
1.3.1. MICROCISTINAS: DIVERSIDADE E MODO DE ACTUAÇÃO.....	8
1.3.2. OCORRÊNCIA DE MICROCISTINAS EM PORTUGAL.....	13
1.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS.....	14
1.4.1. BIOENSAIOS.....	14
1.4.2. CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	17
1.4.3. ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	17
1.4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	18
1.4.5. MÉTODOS IMUNOLÓGICOS.....	21
1.5. PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM MICROCISTINAS	21
1.6. OBJECTIVOS	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1. RECOLHA DE AMOSTRAS DE CIANOBACTÉRIAS NA LAGOA DE MIRA.....	24
2.2. ISOLAMENTO E CULTURA DE MICROCYSTIS AERUGINOSA EM LABORATÓRIO	27
2.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROCYSTIS AERUGINOSA	28
2.3.1. QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS POR ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	28
2.3.2. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS POR HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	29
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. OCORRÊNCIA DE MICROCYSTIS AERUGINOSA NA LAGOA DE MIRA	31
3.2. ISOLAMENTO E CULTURA DE MICROCYSTIS AERUGINOSA.....	31
3.3. IDENTIFICAÇÃO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA AO MICROSCÓPIO ÓPTICO. ...	35
3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROCYSTIS AERUGINOSA	41
3.4.1. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	41
3.4.2. HPLC	43
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

As cianobactérias são microrganismos muito importantes, no que se refere à produção de oxigénio no entanto, quando se desenvolvem em grandes quantidades, florescências, podem ter consequências negativas do ponto de vista biológico e estético, pois provocam situações de anoxia e alteração das características organolépticas da água, aquando da sua decomposição, para além da produção de potentes toxinas (Vasconcelos, 1995).

As cianobactérias, que formam florescências superficiais, parecem ter uma elevada tolerância para grandes intensidades luminosas Paerl *et al* (1983) *in* Mur *et al.* (1999), relaciona esta capacidade com o aumento na produção de carotenóides, que protegem as células da fotoinibição.

Durante o período vegetativo, muitas cianobactérias desenvolvem grandes agregados (colónias), podendo ser de células cocóides ou filamentosas, que não se distribuem homoganeamente pela coluna da água. Este desenvolvimento existe em vários géneros como o caso de *Microcystis*. Na superfície da água, a razão de fotossíntese destas colónias é grande e as suas células acumulam grandes quantidades de hidratos de carbono. Apesar das células possuírem vesículas gasosas, os pesados hidratos de carbono actuam como lastro e induzem o afundamento das colónias. Assim as colónias maiores afundam mais rapidamente do que as pequenas e células solitárias raramente mostram migração vertical (Mur *et al.*, 1999).

Por afundamento, as colónias conseguem então deslocar-se, afastando-se da zona eufótica. Aí, sem luz, usam os hidratos de carbono acumulados para realizarem a respiração, libertando com isso dióxido de carbono, que acumulam nas vesículas gasosas (Utkilen *et al.*, 1985 *in* Mur *et al.*, 1999). Graças à acumulação deste gás, as colónias tornam-se então capazes de flutuar e voltarem à zona eufótica da coluna de água.

Esta regulação permite às colónias posicionarem-se nas condições luminosas que lhes são óptimas para o seu crescimento (Mur *et al.*, 1999). A frequência, com que ocorre esta migração vertical, é dependente do tamanho das colónias.

Microcystis é um género de cianobacteria distribuído mundialmente em vários ecossistemas dulciaquícolas.

As espécies pertencentes a este género, com vesículas gasosas no interior das suas células, têm um papel muito importante nas águas eutróficas. O desenvolvimento da sua massa e significado ecológico (florescências e toxicidade), colocam-nas entre os microrganismos planctónicos mais importantes (Komarek, 1991).

A taxonomia destas espécies é geralmente baseada no estudo da célula e na morfologia das suas colónias em populações naturais ou em estirpes isoladas experimentalmente (Komarek, 1991), assim como nas características da sua mucilagem (e.g. Komarek, 1958 *in* Tatsumi *et al.* 1991).

Uma vez que o aumento do crescimento massivo de *Microcystis* tem dado origem a vários problemas nos ambientes aquáticos e na monitorização das águas usadas para consumo, torna-se necessário uma aproximação taxonómica mais analítica e não só uma identificação morfológica. Assim, por exemplo, o estudo de diferenças aloenzimáticas entre espécies permite uma identificação mais rigorosa, uma vez que analisa variações intra e inter específicas das cianobactérias, tendo por base o génotipo e não só o fenótipo (Tatsumi *et al.*, 1991).

Segundo Tatsumi *et al.* (1991), tem vindo a tornar-se claro que para *Microcystis aeruginosa* existem dois tipos morfológicos, baseados na média do seu tamanho celular e formação de colónias: o tipo S e o tipo L. O tipo S (smaller) inclui estirpes com tamanhos celulares médios entre 3.25µm e 4.19µm e o tipo L (larger) inclui estirpes com tamanhos celulares médios entre 4.85µm a 5.08µm. Verificou-se também que estes tipos celulares divergem geneticamente quanto à composição alélica, o que reforça a ideia de *Microcystis aeruginosa* comportar de facto dois tipos morfológicos diferentes. Isto tem interesse, caso se entenda que, na medida em que se verifica a existência desta divergência morfológica e genética, estas variantes podem eventualmente já ter sido identificadas como espécies diferentes.

1.2. DINÂMICA DE *MICROCYSTIS* EM ECOSISTEMAS TEMPERADOS

A altura e duração das épocas de florescências de cianobactérias depende grandemente das condições climáticas da região. Em zonas temperadas, a ocorrência de grandes massas de cianobactérias são mais proeminentes durante o final do Verão e o início do Outono, podendo durar de 2 a 4 meses. Em regiões com climas mais Mediterrânicos ou sub-tropicais, as florescências podem começar mais cedo e persistir mais tempo. No Japão, Portugal, Espanha, África do Sul e sul da Austrália, as florescências poderão ocorrer por mais de 6 meses (Sivonen & Jones, 1999).

Em regiões temperadas, onde se insere o nosso país, e segundo Mur *et al.*(1999), à medida que as temperaturas decrescem no Outono, a fotossíntese torna-se mais rápida do que a respiração e o lastro de hidratos de carbono não é consumido. Como resultado, as colónias afundam até ao fundo da coluna de água onde poderão sobreviver no Inverno, consumindo gradualmente os seus hidratos de carbono, por respiração aeróbia ou anaeróbia. Assim, as colónias, que emergem na Primavera, são geralmente de dimensões muito pequenas. Durante este período, torna-se difícil de reconhecer, em amostras de plâncton, as colónias de *Microcystis* sp. Mais tarde, no Verão, são mais facilmente identificadas.

As florescências de *Microcystis*, nestas regiões temperadas, ocorrem particularmente em massas de água com profundidades maiores que 3 metros, pois a zona eufótica é bastante superficial e o fundo misturado. Contudo, mesmo nestes lagos superficiais, onde este género não tem vantagens competitivas na migração vertical, *Microcystis* sp. pode tornar-se dominante e formar florescências substanciais (Mur *et al.*, 1999). É o que acontece na Lagoa de Mira, onde apesar de existirem duas espécies de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* forma muitas vezes florescências dominantes in Vasconcelos *et al.*(1993).

Microcystis aeruginosa é uma espécie de cianobactéria que se desenvolve normalmente em águas doces eutróficas de reservatórios e às vezes forma florescências intensas. É a espécie citada mais comum pertencente a este género (Komarek,1991).

Esta espécie é conhecida por ter uma distribuição cosmopolita, com excepção das áreas polares e subpolares e nas regiões tropicais não é tão comum como muitas outras espécies (Komarek,1991).

1.3. TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS

Segundo Carmichael *et al.* (1996), a maior parte dos florescências cianobacterianas, são potencialmente tóxicas e todos os grupos de animais podem ser afectados. Enquanto que a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas, só pode ser verificada pela análise microscópica das espécies presentes, existem algumas pistas visuais e olfactivas da sua presença. Assim, uma vez que as cianobactérias possuem vesículas gasosas, elas podem flutuar e concentrar-se na superfície da água, ao longo das margens, por acção da ondulação ou do vento. As florescências assim concentradas, parecem apresentar bandas de cor, que varia entre o verde claro e escuro para as formadas pelos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria*, ou ser de cor castanha avermelhada para as florescências formadas só por *Oscillatoria*.

Com o envelhecimento da florescência, os pigmentos azuis (ficocianinas), libertam-se das células e secam nas superfícies expostas, como manchas azul turquesa. O cheiro de uma florescência recentemente acumulada, tem sido descrito como cheiro de relva cortada ou feno, mas à medida que a florescência envelhece, assemelha-se ao cheiro de silagem fermentada ou lixo podre (Carmichael *et al.*, 1996).

O envenenamento de animais por cianobactérias de um modo geral, pode ocorrer através do consumo de células bacterianas ou indirectamente através do consumo de outros animais, que se tenham alimentado com cianobactérias e cianotoxinas acumuladas, pois as microcistinas, bioacumulam-se em vertebrados aquáticos e invertebrados, incluindo peixes (Carbis *et al.*,1997; Beattie *et al.*,1998), mexilhões (Eriksson *et al.*, 1989; Falconer *et al.*,1992; Prepas *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*,1997) e também em zooplâncton (Watanabe *et al.*,1992) in Sivonen & Jones, 1999).

Em mexilhões, a concentração mais elevada foi encontrada no hepatopâncreas, enquanto que nos vertebrados é encontrada no fígado (Sivonen & Jones, 1999).

Vasconcelos (1999), refere que em mexilhões, as toxinas são normalmente acumuladas e persistentes por vários dias após o contacto com cianobactérias. Em lagostins, a toxina acumula-se preferencialmente no estômago, sendo depurada muito lentamente e em carpas o nível de toxinas, apesar de não ser muito elevado, foi encontrado no músculo e não só nas vísceras. Por isso, a contaminação de moluscos, crustáceos e peixes, deveria ser monitorizada, uma vez que são pescados e vendidos para consumo humano.

O risco para os humanos irá depender dos níveis de consumo destes organismos contaminados e/ou do consumo ou contacto com águas contaminadas.

Segundo Carmichael *et al.* (1996), na América do Norte, foram relatados vários casos de dores de cabeça, cólicas estomacais, náuseas e diarreias dolorosas, após a ingestão de pequenos volumes de águas com florescências de *Microcystis* e *Anabaena*.

Os mecanismos de toxicidade das cianobactérias correntemente descritos e entendidos, são muito diversos e consideram-se desde efeitos hepatóxicos, neurotóxicos, dermatóxicos e até inibição geral da síntese proteica (Sivonen & Jones, 1999).

Carmichael *et al.* (1996), refere que a maioria dos envenenamentos provocados por microcistinas e nodularinas, envolve hepatotoxicose aguda. Nos géneros produtores destas toxinas inclui-se *Microcystis*, que é o género mais distribuído mundialmente, e que inclui três espécies tóxicas conhecidas: *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* e *Microcystis wesenbergi*. A espécie *Microcystis aeruginosa* tem sido muito utilizada em estudos laboratoriais, sobre efeitos toxicológicos e esses estudos permitiram verificar que, após a ingestão, as toxinas são libertadas das células cianobacterianas, para o estômago e absorvidas preferencialmente em certas áreas do intestino como o íleum, que possui elevados níveis de transportadores. Os hepatócitos são as células alvo e em todos os animais afectados, estas células hepáticas concentram as toxinas através de mecanismos de transporte dos ácidos biliares. As hepatotoxinas vão induzir alterações nos filamentos proteicos do citoesqueleto dos hepatócitos, levando a

mudanças na forma das células e à perda da adesão entre células. Com isto e com a destruição das células parenquimatosas e sinusoidais do fígado, ocorre uma hemorragia intrahepática letal em minutos ou horas ou falha hepática dentro de horas ou alguns dias. Em resultado destas alterações, os animais afectados por hepatotoxinas, revelam alguns sintomas típicos, como fraqueza, relutância em se movimentarem, anorexia, palidez das extremidades, membranas e mucosas, e por vezes confusão mental.

Alguns animais, especialmente gado que consiga sobreviver a um caso agudo de envenenamento do fígado, pode experimentar fotosensibilidade levando mesmo à perda de pele nas zonas mais expostas à luz solar. A terapia geral para o tratamento de toxicoses em organismos vivos, não está suficientemente estudada, contudo alguns agentes químicos poderão trazer algum benefício, como a colinesteramina e o carvão activado. Poder-se-á ainda administrar aos animais, sangue ou soluções com glucose como terapia de apoio. Também a ciclosporina-A, rifampina e silenarina, foram administrados em animais de laboratório e têm sido bem sucedidos na inibição da absorção das microcistinas pelos hepatócitos (Carmichael *et al.*, 1996).

Jochimsen *et al.* (1997), refere um caso de intoxicação por microcistinas, em 117 (89%) pacientes de um centro de hemodiálise, no Brasil. Este centro recebia água não tratada de um reservatório natural, contaminado com microcistinas. Os doentes apresentaram perturbações visuais, náuseas, vômitos e de 100 pacientes que apresentaram falha aguda do fígado, associada à hemodiálise, 48 morreram em Março de 1996.

De uma maneira geral, todo o contacto com águas contaminadas com cianobactérias, deve ser evitado, mesmo por simples actividades de lazer e principalmente o seu consumo.

Ressom *et al.* (1994) in Carmichael *et al.* (1996), refere que não é possível especificar níveis seguros de cianobactérias na água usada para recreio ou banhos, embora na Austrália, o New South Wales Bluee-Green Algae Task Force, recomende um nível máximo de 15.000 cél/ml, como limite aceitável para exposição e contacto com cianobactérias.

No Canadá, o limite proposto para a concentração de MCYST - LR, nas águas utilizadas para consumo humano, foi de 0,5 µg/l e para microcistinas totais 1 µg/l (Kuiper-Goodman *et al.*, 1994 *in* Ueno *et al.* (1996)), embora, os níveis de MCYST-LR, admitidos pela WHO (World Health Organization), para águas usadas para consumo humano seja de 1 µg /l (WHO, 1998 *in* Falconer *et al.*, 1999).

Algumas actividades e respectivos níveis de exposição a cianobactérias encontram-se na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. – Níveis de Exposição a cianobactérias em algumas actividades aquáticas.
(Adaptado de Resson *et al.* (1994) *in* Carmichael *et al.*(1996)).

Exposição elevada	Alguma exposição	Pouca ou Nenhuma exposição
Natação	Canoagem	Pesca
Mergulho	Vela	Cruzeiros
Esqui Aquático	Remo	Recreio nas margens
Chapinar		

A ocorrência de florescências de cianobactérias tóxicas, como o caso de *Microcystis aeruginosa*, em águas doces utilizadas para consumo humano e recreio, deve ser seriamente considerada, uma vez que as microcistinas são potentes toxinas promotoras de tumores (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992 *in* Vasconcelos *et al.*, 1996).

1.3.1. MICROCISTINAS: DIVERSIDADE E MODO DE ACTUAÇÃO

As toxinas produzidas por cianobactérias, podem ser de três tipos químicos e que são, peptídeos, alcalóides ou lipopolissacarídeos (Sivonen & Jones, 1999).

Segundo Sivonen & Jones (1999), as microcistinas (MCYST), são peptídeos cíclico - hepatotóxicos. As primeiras estruturas químicas de toxinas deste tipo, foram identificadas no início de 1980 e o número de variantes destas toxinas, foi aumentando durante os anos 90. Assim, os primeiros compostos deste tipo encontrados em cianobactérias de água doce, foram de facto cíclico - heptapeptídeos, com uma estrutura geral ciclo-(D-alanina¹ -X² - D - MeAsp³ - Z⁴ - Adda⁵ - Dglutamato⁶ - Mdha⁷), na qual X e Z representam aminoácidos, L- variáveis (Fig. 1.1).

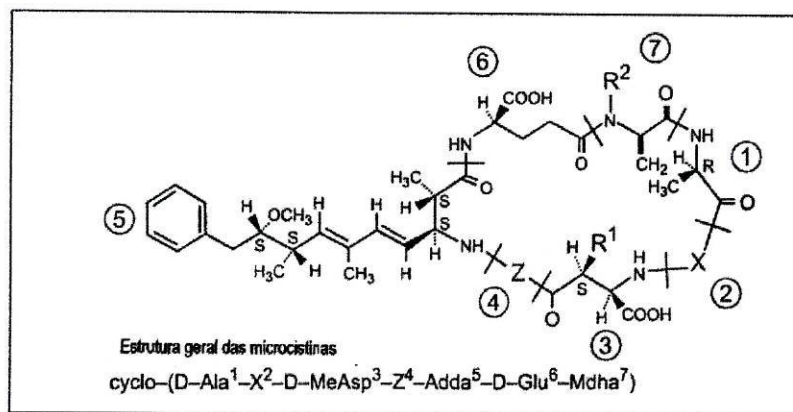


Figura 1.1. – Estrutura geral das microcistinas, (modificado de Sivonen & Jones, 1999).

Como este composto foi pela primeira vez isolado em cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa*, passou a denominar-se duma forma generalista como microcistina (Carmichael *et al.*, 1988 *in* Sivonen & Jones, 1999).

A terminologia usada na identificação das microcistinas, consiste no uso de abreviaturas que indicam os dois aminoácidos variáveis que estão presentes, assim

como exemplo, MCYST – LR é a microcistina que contem Leucina (L) e Arginina (R) como aminoácidos variáveis (Lawton *et al.*,1994).

Existe um grande número de microcistinas (mais de 64) já perfeitamente identificadas. Em estirpes de *Microcystis aeruginosa*, foram encontradas 19 microcistinas diferentes, por vários autores (Tab. 1.2.).

Tabela 1.2. – Microcistinas (MCYST) produzidas por *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*) e outras espécies cianobacterianas, referenciadas em literatura científica, (Adaptado de Sivonen & Jones, 1999).

Microcistina	Peso Molecular	Cianobactéria	Referência
MCYST-LA	909	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. viridis</i>	Botes <i>et al.</i> , 1984 Kaya e Watanabe, 1990
MCYST-LA _{ba}	923	<i>M. aeruginosa</i>	Gathercole e Thiel, 1987
MCYST-LL	951	<i>M. aeruginosa</i>	Craig <i>et al.</i> , 1993
MCYST- YA	959	<i>M. aeruginosa</i>	Botes <i>et al.</i> , 1985
[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MCYST - LR	966	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena sp.</i>	Harada <i>et al.</i> , 1991b Sivonen <i>et al.</i> , 1992a
MCYST - VF	971	<i>M. aeruginosa</i>	Bateman <i>et al.</i> , 1995
[D-Asp ³]MCYST-LR	980	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena flos-aquae</i> ; <i>M. Viridis</i> ; <i>O. agardhii</i>	Krishnamyrthy <i>et al.</i> , 1989 Cremer e Henning, 1991 Harada <i>et al.</i> , 1990b; 1991a; Luukkainen <i>et al.</i> , 1993
[Dha ⁷]MCYST-LR	980	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena sp.</i> ; <i>O. agardhii</i>	Harada <i>et al.</i> , 1991b Sivonen <i>et al.</i> , 1992a
MCYST-LF	985	<i>M. aeruginosa</i>	Azevedo <i>et al.</i> , 1994
MCYST-LR	994	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena flos-aquae</i> ; <i>M. viridis</i>	Botes <i>et al.</i> , 1985 Rinehart <i>et al.</i> , 1988
MCYST-LY	1.001	<i>M. aeruginosa</i>	Stoner <i>et al.</i> , 1989
[D-Asp ³ ,Dha ⁷]MCYST-RR	1.009	<i>M. aeruginosa</i>	Luukkainen <i>et al.</i> , 1994
[D-Asp ³]MCYST-RR	1.023	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena sp.</i> ; <i>O. agardhii</i>	Luukkainen <i>et al.</i> , 1994
[Dha ⁷]MCYST-RR	1.023	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>Anabaena sp.</i> ; <i>O. agardhii</i>	Kiviranta <i>et al.</i> , 1992 Sivonen <i>et al.</i> , 1992a
MCYST-LW	1.024	<i>M. aeruginosa</i>	Bateman <i>et al.</i> , 1995
[Dha ⁷]MCYST-YR	1.030	<i>M. aeruginosa</i>	Sivonen <i>et al.</i> , 1992c
MCYST-YM(O)	1.035	<i>M. aeruginosa</i>	Botes <i>et al.</i> , 1985 Elleman <i>et al.</i> , 1978
MCYST-RR	1.037	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>M. Viridis</i>	Kusumi <i>et al.</i> , 1987 Painuly <i>et al.</i> , 1988
MCYST-YR	1.044	<i>M. aeruginosa</i> ; <i>M. Viridis</i>	Botes <i>et al.</i> , 1985 Watanabe <i>et al.</i> , 1988

Legenda: Aba – Ácido aminoisobutírico; Dha – dehidroalanina; M(O) – Óxido-S-Metionina

Os peptídeos cíclicos, são produtos com peso molecular entre 800 e 1100, contudo são pequenas moléculas, quando comparadas com outros oligopeptídeos e polipeptídeos celulares (com p.m. maior que 10 000). No caso das microcistinas, estes peptídeos contêm 7 a.a., com os dois a.a. terminais condensados formando um composto cíclico. Estas moléculas são hidrosolúveis na sua maioria, e a sua entrada para o interior das células alvo, ocorre através da ajuda de transportadores de membrana. Isto restringe grandemente os órgãos alvo, sendo um deles o fígado (Sivonen & Jones, 1999).

Craig *et al.*, (1993) *in* Carmichael, (1997), refere que as microcistinas de natureza mais hidrofóbica, podem ter grande utilidade no estudo dos efeitos celulares das microcistinas, uma vez que estas penetram mais rapidamente nas células, do que as microcistinas mais hidrofílicas, como o caso de MCYST-LR.

Os estudos realizados para compreender o mecanismo de actuação das microcistinas, ao nível celular e molecular, têm mostrado que estas toxinas têm uma grande afinidade para o fígado (órgão alvo), ligando-se especificamente ás fosfatases proteicas PP1 e P2A (Runnegar *et al.*, 1993, 1995b; Lin & Chu, 1994^{a,b}; Nishiwaki *et al.*, 1994 *in* Carmichael, 1997). A toxicidade das microcistinas, é uma consequência directa da inibição destas fosfatases, nos hepatócitos e a perda da integridade sinusoidal do fígado, associada a esta toxicidade que leva ao choque hemorrágico, ocorre após a destruição dos hepatócitos (Runnegar *et al.*, 1995b *in* Carmichael, 1997).

A variação qualitativa das microcistinas presentes é mais frequentemente encontrado em estirpes de *Anabaena* mas também ocorre em *Microcystis* (Sivonen *et al.*, 1995).

Como exemplo, algumas estirpes de *Microcystis* no Japão pareceram conter principalmente MCYST - LR, MCYST - RR e MCYST - YR, havendo algumas culturas que continham as três variantes e outras sendo dominadas por uma delas. Estas variantes são as únicas apresentadas em vários estudos de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis viridis* (ex. Watanabe, 1996 *in* Sivonen & Jones 1999).

MCYST - LR é muitas vezes mencionada, como a microcistina mais frequentemente encontrada, apesar dessas observações poderem ter sido baseadas no

facto do padrão químico para a sua análise, ser o primeiro a estar comercialmente disponível. Foi também já referida, como sendo a toxina predominante, em amostras de florescências ocorridas em Portugal (Vasconcelos *et al.*, 1995, 1996) em França (Vezie *et al.*, 1997), Canadá (Kotak *et al.*, 1993) e frequentemente co-ocorrendo, com as MCYST - RR e MCYST - YR no Japão (Watanabe *et al.*, 1988, 1989, Sivonen & Jones, 1999).

Normalmente, a concentração da toxina em grama de peso seco é máxima no Verão e Outono, quando a biomassa cianobacteriana domina a matéria seca (Wicks & Thiel, 1990; Watanabe *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1993b; Kotak *et al.*, 1995; Mansalek *et al.*, 1995; Vezie *et al.*, 1998, *in* Sivonen & Jones (1999).

No caso de mudanças de luz ou temperatura e até na presença de elevadas concentrações de fósforo, as estirpes de cianobactérias hepatotóxicas, produzem mais toxinas, embora a maioria dos estudos, indique que as cianobactérias de uma maneira geral, produzem a maior parte das suas toxinas, quando sob condições bastante favoráveis ao seu crescimento, (Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas são extremamente estáveis e resistentes à hidrólise química ou oxidação, quando em pH neutro. Mesmo depois de serem fervidas as microcistinas continuam activas. Em ambientes aquáticos naturais e na escuridão, as microcistinas podem persistir por meses ou até anos. Em estações de tratamento águas, as microcistinas podem ser oxidadas pelo ozono, ou outros agentes oxidantes fortes e degradam-se com luz UV intensa (Sivonen & Jones, 1999).

Segundo Welker & Steinberg (1998) *in* Sivonen & Jones (1999), aproximadamente 40% das microcistinas, são degradadas por dia sob condições de insolação, no Verão. Em plena luz solar, as microcistinas sofrem um esgotamento fotoquímico e isomeração, com o aumento da taxa de reacção, pela presença de pigmentos solúveis na água, provavelmente ficobilinas (Tsuji *et al.*, 1993 *in* Sivonen & Jones, 1999).

Segundo Kohl *et al.* (1988), muitas vezes as cianobactérias perdem determinadas características, quando em situação de culturas laboratoriais, como perda de conteúdo das vesículas gasosas, excreção de material mucilaginoso e formação das

colónias, muitas vezes relacionado com a mudança da intensidade luminosa ou aumento de temperatura ou pH.

1.3.2. OCORRÊNCIA DE MICROCISTINAS EM PORTUGAL

Em Portugal a ocorrência de cianotoxinas, reveste-se de grande importância uma vez que sendo este, um país com escassez de água, são utilizados alguns reservatórios de água eutróficos, para consumo humano (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Segundo Vasconcelos (1999), as cianobactérias tóxicas são comuns em águas Portuguesas e as toxinas mais comuns são as microcistinas. Desde 1990 que têm sido relatados um número significativo de reservatórios de água com grandes níveis de MCYST-LR, que são usados para consumo humano.

Num estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (1995, 1996), foi verificado que MCYST-LR é a microcistina dominante em águas doces portuguesas, embora outras toxinas também sejam comuns como, MCYST - RR, MCYST - YR, MCYST - LA e [D - Asp³] MCYST - LR. Foi também verificado que a maior parte das florescências estudadas eram muito hepatotóxicas contendo de 2 a 7 microcistinas diferentes.

Segundo Vasconcelos *et al.* (1996), as concentrações de microcistinas da ordem dos 1,0 a 7,1 µg/mg, encontrados nas várias florescências em Portugal, podem expor as populações humanas a elevadas doses de toxinas.

A Lagoa de Mira, local de estudo deste trabalho, é uma pequena lagoa, localizada na região centro-litoral, entre Aveiro e a Figueira da Foz, dista aproximadamente 5 Km do mar (Fig. 2.1). Está rodeada por alguns campos de cultivo e um empreendimento hoteleiro, que utiliza a lagoa directamente, como local recreativo para os hóspedes. Assim, esta lagoa é utilizada essencialmente para lazer dos habitantes locais e dos turistas, nomeadamente para natação, passeios de barco sem motor e alguma pesca.

Se considerarmos estes dados, facilmente se verifica a importância deste tipo de estudos, uma vez que como já referido, muitas actividades de recreio desenvolvidas em

ecossistemas dulciaquícolas como a Lagoa de Mira, podem expor as populações a elevados riscos de contaminação por MCYST - LR, advindo desse contacto todos os possíveis efeitos hepatotóxicos, referidos anteriormente.

1.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE CIANOBACTÉRIAS

Existe um número diverso de métodos laboratoriais, que se podem usar para detectar e identificar cianotoxinas na água e nas células bacterianas.

Todos os métodos fornecem informações diferentes e muitas vezes complementares, assim a escolha do método, ou a combinação de métodos a utilizar, deve depender do objectivo e do tipo de informação necessária, para a análise que se pretenda realizar.

Seguidamente apresentam-se alguns dos métodos mais utilizados, por vários investigadores, na avaliação de toxicidade de cianobactérias.

1.4.1. BIOENSAIOS

É o método biológico mais usado em ensaios de toxicidade de florescências. Apesar do bioensaio possibilitar a determinação da toxicidade total das cianotoxinas, em poucas horas, não é geralmente muito sensível ou específico.

1.4.1.1. BIOENSAIOS COM RATOS

Os animais mais utilizados neste ensaio são machos de rato suíços albinos. A toxicidade é testada por injeção intraperitoneal de 0.1-1.0 ml de um preparado de cianobactérias, que previamente sofrem lise, por sonicação ou por congelamento, da suspensão celular esterilizada por ultra filtração por membrana. Os ratos são observados durante 24 horas e depois mortos e os seus tecidos observados, diagnosticando-se o tipo de cianotoxina, mediante os danos tecidulares observados. A toxicidade é posteriormente, expressa como LD₅₀ mg/peso seco por Kg de peso corporal do rato (Harada *et al.*, 1999).

1.4.1.2. BIOENSAIOS COM INVERTEBRADOS

Vários invertebrados têm sido investigados para avaliar as suas possibilidades como fiáveis vias de bioensaios para o estudo da toxicidade de cianotoxinas. Um dos mais usados tem sido o pequeno crustáceo *Artemia salina*, uma vez que não necessita de grandes cuidados na manutenção em laboratório nem de nenhum equipamento especializado. Estes organismos têm sido explorados por vários anos para a detecção de metabolitos secundários e são actualmente comercializados como um teste standardizado (Kit). Alguns destes ensaios, têm utilizado alguns organismos do género *Daphnia*, como *Daphnia magna*, e têm conseguido detectar com sucesso diversas microcistinas, embora a sua cultura necessite um trabalho intensivo (Baird *et al.*, 1989 *in* Harada *et al.*, 1999). Existem ainda outros Kits preparados e disponíveis no mercado, com outros invertebrados como *Thamnocephalus platyurus*. Um dos inconvenientes destes testes é que além de serem onerosos do ponto de vista económico, têm um tempo de validade limitado de 6 meses. A vantagem é que os resultados obtidos por este método são altamente reproduzíveis e apresentam uma diminuta variabilidade entre laboratórios diferentes (Kozma, 1997 *in* Harada *et al.*, 1999).

Outro grupo de invertebrados utilizados nestes ensaios, são os mosquitos, podendo os adultos ser injectados e as larvas emersas em extractos aquosos de cianotoxinas. Ambas as vias apresentam sensibilidade razoável, embora esta prática ainda não tenha sido muito utilizada devido às dificuldades inerentes ao manuseamento destes organismos. Outro insecto, que tem sido usado para detectar microcistinas com sucesso, é a vulgar mosca do vinagre *Drosophila melanogaster* (Swoboda *et al.*, 1994 *in* Harada *et al.*, 1999). Estes organismos são relativamente fáceis de manter em laboratório, sem necessitarem de nenhum equipamento especial. A toxina, neste caso é administrada oralmente através de discos de papel de filtro embebidos numa solução de sacarose, à qual se adiciona a microcistina, estes filtros assim preparados, colocam-se em tubos contendo os insectos, que previamente tenham estado numa situação de jejum por 24 horas. Outros insectos e crustáceos tem também sido estudados na detecção e determinação de LD₅₀, para outras cianotoxinas como a saxitoxina, pois demonstraram não ser sensíveis para detectar microcistinas (Harada *et al.*, 1999).

1.4.1.3. BIOENSAIOS COM BACTÉRIAS

Estes bioensaios tem vindo a ser investigados para poderem vir a ser métodos simples para detecção de cianotoxinas. Um dos testes com maior sucesso é o ensaio de Bioluminescência Microtox, que indica o nível de toxicidade por uma redução na emissão de luz pela bactéria *Photobacterium phosphoreum*. Investigações preliminares têm indicado que este sistema é bastante adequado para uma rápida detecção de microcistinas em amostras de fluorescências (Lawton *et al.*, 1990 *in* Harada *et al.*, 1999). Porém alguns investigadores têm concluído que a correlação entre os resultados obtidos por este método e o conteúdo tóxico das células, é muito pequena, não sendo por isso uma metodologia muito divulgada nestas análises (Harada *et al.*, 1999).

1.4.2. CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Este método é considerado um bom substituto para os bioensaios com ratos, apresentando uma boa correlação com os resultados obtidos com organismos vivos. Recorre ao uso de células susceptíveis de serem afectadas pelas cianotoxinas, como os hepatócitos, verificando a sua alteração ao longo do tempo por ação da toxina, escusando assim o sacrifício de animais. Os hepatócitos de rato são incubados com toxinas puras ou com extractos de florescências por 4 a 20 horas e depois a viabilidade celular é avaliada segundo um teste MTT ((3,4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromido) (Harada *et al.*, 1999).

Outras células como fibroblastos e células sanguíneas, têm sido também estudadas em ensaios de toxicidade de microcistinas, embora com resultados inferiores ao obtidos com hepatócitos, e portanto não muito utilizadas (Harada *et al.*, 1999).

1.4.3. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

O ensaio de inibição da fosfatase proteica, é um método muito sensível para microcistinas e nodularinas, usando a actividade bioquímica destas toxinas. Este método é capaz de detectar níveis da ordem dos nanogramas de microcistinas além de ser um ensaio bastante rápido permitindo a análise de várias amostras em poucas horas. Uma versão deste método, baseia-se na quantificação do fosfato P^{32} , libertado de um substrato radioactivo (Holmes, 1991, Lambert *et al.*, 1994 *in* Harada *et al.*, 1999) pela actividade da enzima fosfatase (PP1 e PP2A). Este método tem sido aplicado para detectar microcistinas em ambientes marinhos, em extractos de fígado de salmão do Oceano Atlântico, afectado com doenças hepáticas (Andersen *et al.*, 1993 *in* Harada *et al.*, 1999), microcistinas hidrofóbicas produzidas por cianobactérias de ambientes dulciaquícolas (Craig *et al.*, 1993 *in* Harada *et al.*, 1999) e ainda para quantificar microcistinas existentes em águas usadas para consumo humano, antes e após tratamento dessas águas (Lambert *et al.*, 1994 *in* Harada *et al.*, 1999).

Apesar desta metodologia ser bastante usada em investigação, tem havido uma certa relutância, em a utilizar como prática corrente de programas de monitorização de microcistinas, devido à necessidade do uso de material radioactivo, a todo o equipamento de laboratório altamente específico e as regras de segurança muito rígidas, que esse material exige.

Porém An e Carmichael (1994) *in* Harada *et al.*, (1999), têm usado um ensaio colorimétrico de inibição de fosfatases proteicas, que evita as complicações do uso de materiais radioactivos. Este método tem revelado grande importância, na confirmação da actividade biológica e na toxicidade de microcistinas de amostras naturais (Harada *et al.*, 1999).

1.4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos analíticos usam as propriedades fisico-químicas das cianotoxinas, como peso molecular, cromóforos e reactividade devido aos grupos funcionais das moléculas.

1.4.4.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

O sistema analítico mais comumente usado para esta classe de cianobactérias é o HPLC. Este método combinado com a detecção por UV, tem sido extensivamente usado para detecção de microcistinas, pois é um método quantitativo bastante sensível, é necessário o uso de microcistinas padrão, uma vez que este método depende dos tempos de retenção das diferentes microcistinas (Harada, 1996 *in* Harada *et al.*, 1999).

Os inconvenientes do uso desta análise são: a preparação das amostras e o funcionamento do sistema, ambos demorados, o facto de existirem poucos padrões disponíveis, e de necessitar de um grande volume de água para baixas concentrações, além de ser dispendioso.

Além disso, subsiste um problema fundamental, com mais de 60 microcistinas conhecidas é impossível criar uma livraria espectral definitiva, o que se torna num factor limitativo quando se usa este método para identificar microcistinas desconhecidas (Harada *et al.*, 1999).

Um caso particular que reflecte esta problemática foi recentemente descrito por Park *et al.* (2001), o qual refere a descoberta uma nova microcistina anteriormente encontrada mas não identificada, isolada de uma florescência no Canadá no lago Pakowki (Alberta), a nova microcistina (D-Leu¹) MCYST - LR, é a primeira identificada num total de 64 microcistinas conhecidas com ambos os a.a. D e L - Leu, e só foi possível esta identificação através do uso da análise aminoacídica e espectroscopia UV.

1.4.4.2. LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)

É um método muito prometededor porque permite simultâneamente, a separação e a identificação de microcistinas de uma solução. Um método mais avançado de bombardeamento atómico combinado com LC/MS (FAB LC/MS), permite a quantificação de microcistinas ao nível dos ng, em amostras de água ou amostras biológicas (Harada *et al.*, 1999).

1.4.4.3. MMPB

Este método baseia-se na detecção do ácido 2-metil-3-metoxido-4-fenilbutírico (MMPB), como um produto resultante da oxidação das microcistinas. Requer posteriormente a análise por cromatografia gasosa ou HPLC. Contudo para esta análise é necessário realizar extracção, purificação, oxidação e tratamento posterior, de forma a eliminar os reagentes utilizados, o que a torna a sua aplicação um pouco morosa e trabalhosa. Um método melhorado tem sido aplicado, realizando a ozonólise das microcistinas, eliminando assim a necessidade dos procedimentos iniciais referidos.

Assim a análise de MMPB demora somente 30 min, a realizar, com um nível de sensibilidade da ordem dos picomole (Harada *et al.*, 1999).

1.4.4.4. NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

A determinação da estrutura das microcistinas e nodularinas pode ser obtido através do uso da ressonância magnética nuclear. Esta técnica permite obter informação sobre peso molecular de microcistinas conhecidas e desconhecidas. Uma desvantagem é a necessidade de utilizar grandes quantidades de amostra (da ordem dos mg) nem sempre disponíveis, e microcistinas completamente purificadas, como tal este método não é utilizado em estudos de monitorização regulares (Harada *et al.*, 1999).

Contudo é de referir, que esta metodologia foi muito utilizada, inicialmente no estudo da estrutura química das microcistinas. Assim a primeira estrutura química completa, obtida por NMR, foi efectuada por Dawie Botes, diagnosticando a toxina cianoginosina - LR, actualmente conhecida como MCYST - LR (Kusumi, 1996 *in* Carmichael, 1997).

1.4.4.5. MALDI - TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight)

Para a identificação de microcistinas, em amostras muito pequenas (menores que 1mm³ de amostra liofilizada), este método permite obter a massa molecular de todos os peptídeos de uma amostra, dando fortes indicações das variantes de microcistinas presentes, de uma maneira bastante rápida. Contudo a análise quantitativa das microcistinas, não é possível de obter com este método (Harada *et al.*, 1999).

1.4.5. MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

É correntemente a análise mais prometedora, para uma visão rápida da amostra para microcistinas, devido à sua sensibilidade, especificidade e facilidade de operação.

1.4.5.1. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Este método tem sido empregue com sucesso, para quantificação de hepatotoxinas em locais de abastecimento de águas domésticas e extractos de biomassa com um limite de detecção de 0,2 µg/l e 0,25 µg/g, para água e amostras de biomassa respectivamente (Chu *et al.*, 1990, *in* Harada *et al.*, 1999).

O teste ELISA, é um método quantitativo muito sensível, a preparação das amostras é simples e normalmente há uma boa reacção cruzada com as principais microcistinas. Este teste está comercialmente disponível para microcistinas, sob a forma de um Kit e baseia-se num antisoro policlonal, criado em coelhos, contra um soro de albumina bovina conjugado com microcistina - LR.

As desvantagens do uso desta análise, residem na dificuldade de obter anticorpos, não ser muito específico e por vezes ter-se dificuldades na interpretação dos resultados, uma vez que há interferências (Harada *et al.*, 1999).

1.5. PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM MICROCISTINAS

As cianobactérias têm um número especial de propriedades que determinam a sua importância relativa nas comunidades fitoplanctónicas. Contudo o comportamento de diferentes taxa de cianobactérias na natureza não é homogéneo, porque as suas propriedades ecofisiológicas diferem. Para se poderem estabelecer objectivos na manutenção da água é fundamental um entendimento das suas respostas aos factores ambientais (Mur *et al.*, 1999).

A forma preventiva do aparecimento de florescências e consequente contaminação das águas, seria evitar o aporte de nutrientes resultante das escorrências de terrenos, muitas vezes agrícolas e com excesso de adubos, o que não é fácil de obter, uma vez que a adubagem é prática corrente, na maior parte dos terrenos cultivados. As condições climáticas que condicionam o aparecimento de florescências, como o aumento de luminosidade e temperatura, são impossíveis de controlar. Assim, a forma mais capaz de prevenir o aparecimento de florescências, terá de passar pela implementação de uma monitorização periódica do ecossistema, através de análises frequentes do estado da água, por forma a que, ao menor sintoma de eutrofização, se actue de imediato tratando a água.

Existem diversos métodos de tratamento de águas, alguns regulares como a filtração a coagulação e cloração, que nem sempre se mostram eficientes na remoção das cianobactérias e das suas toxinas na água (Vasconcelos *et al.*, 1996). Muitos destes tratamentos, têm ainda o inconveniente de matarem as células por lise celular, originando um problema mais grave de resolver, que é a libertação das toxinas para a água.

Segundo Keijola *et al.* (1988) e Falconer *et al.* (1989) *in* Vasconcelos *et al.* (1996), o uso de ozono ou de carvão activado, são as únicas técnicas seguras conhecidas, que têm eficiência na destruição e remoção das toxinas na água usada para consumo. Nicholson *et al.* (1994) *in* Vasconcelos *et al.* (1996), indica também que elevados níveis de cloro ou cloroamina são também bastante eficientes na destruição de microcistinas, embora o cloro deva ser usado em quantidades moderadas e somente após a remoção de toda a matéria orgânica presente na água.

1.6. OBJECTIVOS

Este trabalho teve por objectivo o isolamento e cultura de estirpes de *Microcystis aeruginosa*, assim como a quantificação e avaliação da diversidade de microcistinas por HPLC e ELISA, e detecção de possíveis diferenças quer em termos quantitativos, quer do perfil de microcistinas, ao longo do período de um ano, na Lagoa de Mira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. RECOLHA DE AMOSTRAS DE CIANOBACTÉRIAS NA LAGOA DE MIRA

Na realização deste trabalho foram efectuadas quatro recolhas de água para obtenção de amostras de cianobactérias, na Lagoa de Mira (Fig. 2.1).

A primeira recolha ocorreu em Setembro de 1999, a segunda colheita em Março de 2000, a terceira em Maio de 2000 e a última em Junho de 2000 (Tab. 2.1). Com a recolha destes dados, pretendeu-se obter estirpes de *Microcystis* de várias estações do ano. As estirpes isoladas foram denominadas por M (Mira) com algarismos, para a recolha de Março e com letras para a recolha de Maio (Tab. 2.1).

A recolha situou-se sempre na margem em local com um máximo de profundidade de 1m.

A amostra de água com cianobactérias, foi obtida através de vários arrastos, com uma rede cónica de plâncton de 50 µm de malha, para concentração destes organismos.

Juntamente com a recolha de água, efectou-se sempre a medição de alguns parâmetros físico-químicos (Tab. 2.2.), como:

- Transparência da água, que foi efectuada utilizando o Disco de Secchi, as medidas apresentadas, representam a profundidade a partir da qual não se vê o Disco
- A temperatura e a concentração em oxigénio, obtidos localmente, pela leitura efectuada num oxímetro (OXI 320/set/ WTW)
- O pH e a condutividade obtidos através de um leitor de pH (Multiline P3, pH/LF-set / WTW).

As amostras foram acondicionadas em malas térmicas, a 4°C, para o seu transporte até ao laboratório, efectuado no mesmo dia.

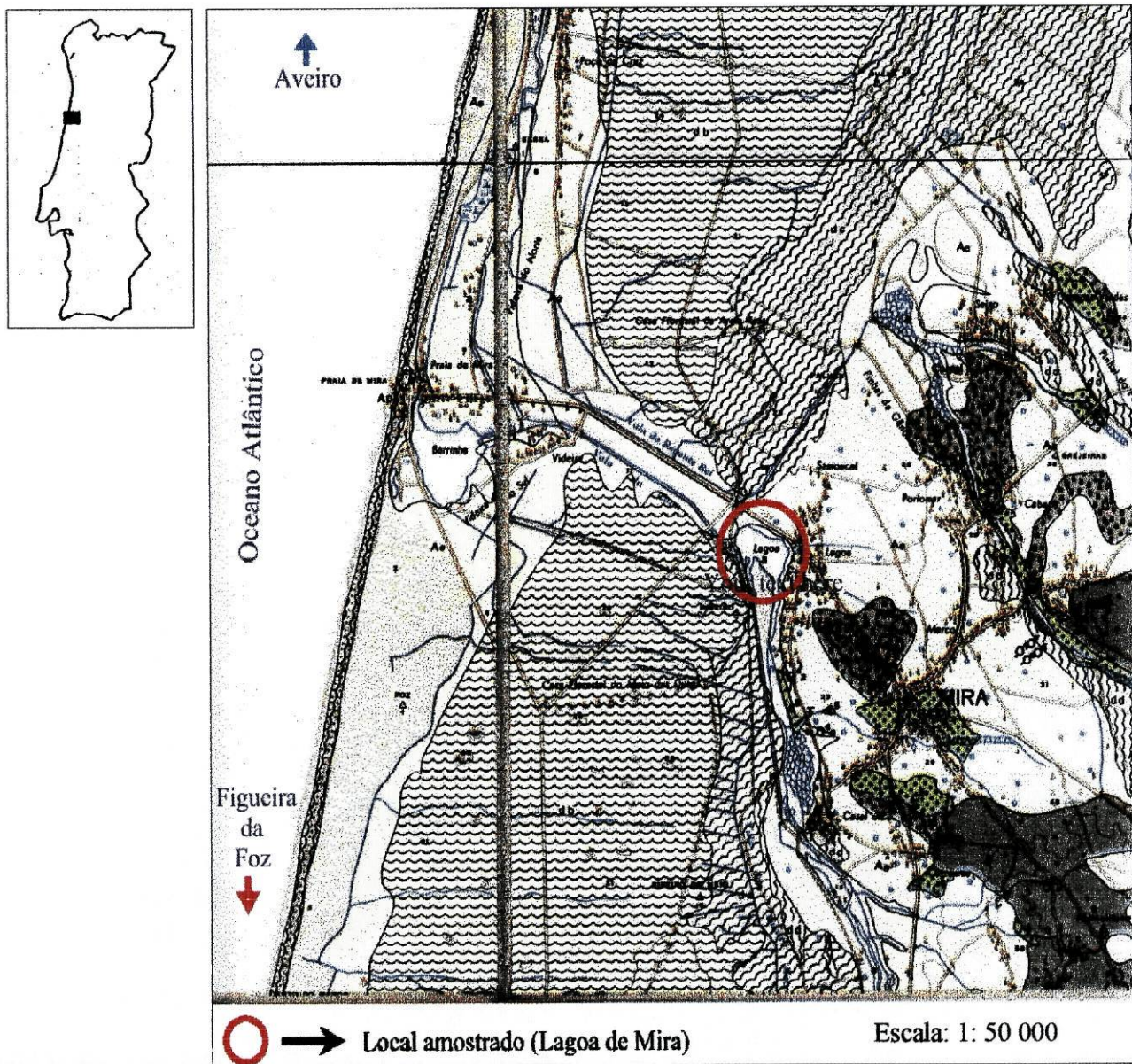


Figura 2.1. - Localização geográfica da Lagoa de Mira .

Tabela 2.1. - Datas das colheitas e respectivas amostras, efectuadas na Lagoa de Mira (M8 a M24 - estirpes de Março; MA a MH - estirpes de Maio).

16/09/1999	21/03/2000	16/05/2000	20/06/2000
morte	M8	MA	morte
	M11	MG	
	M12	MH	
	M13		
	M14		
	M20		
	M22		
	M24		

Tabela 2.2. - Parâmetros físico-químicos da água da Lagoa de Mira, obtidos nas diferentes recolhas.

Parâmetros/Recolhas	16/09/1999	21/03/2000	16/05/2000	21/06/2000
Transparência Sechi	90 cm	1m	1m	80cm
Temperatura sup	20.8°C	16.6 °c	19°C	25.2°C
Temperatura fundo	20.5°C	16.6°C	19°C	25°C
Oxigénio sup.	146.4%	127.7%	73%	76.3%
Oxigénio fundo	147.7%	127.6%	69%	64.4%
pH sup.	7.56	-	-	8.64
pH fundo	7.43	-	-	8.64
Condutividade sup.	410 µs/cm	330 µs/cm	420 µs/cm	391 µs/cm
Condutividade fundo	400 µs/cm	310 µs/cm	420 µs/cm	391 µs/cm

Legenda: - Leitura não efectuada por deficiência no leitor de pH, nesse período

2.2. ISOLAMENTO E CULTURA DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* EM LABORATÓRIO

As amostras foram sempre que possível tratadas no próprio dia da recolha, ou conservadas a 10°C e tratadas nas 24 horas seguintes.

O isolamento das estirpes de cianobactérias compreendeu a utilização do microscópio óptico a uma ampliação de 40x e pipetas de Pasteur estiradas à chama de lamparina. Uma vez que se pretendia estudar a variabilidade qualitativa e quantitativa das toxinas de *Microcystis aeruginosa*, só se procedeu ao isolamento de organismos desta espécie.

As colónias foram lavadas em gotas de água destilada sucessivas vezes, até completa libertação de contaminantes a elas agarradas. Após esta lavagem, as colónias foram resuspendidas em 5 ml de meio Z8 (Kotai, 1972 *in* Vasconcelos, 1995), previamente preparado em tubos de ensaio esterilizados. Esta série de tubos foi colocada numa sala de culturas sob uma luz artificial (lâmpadas fluorescentes Philips, 40W), com uma temperatura de 20 ± 1 ° C e um fotoperíodo de 14 horas. As colónias ficaram nestas condições durante duas semanas, para possibilitar algum crescimento.

Após este período de tempo, as colónias que apresentaram crescimento foram mudadas para um volume de 50 ml de meio Z8, em matrizes de 100ml de capacidade, esterilizados e com rolhas de algodão. Após esta fase continuaram sob as mesmas condições durante 2 ou três semanas. Novamente, as colónias após este período apresentaram crescimento e foram mudadas para matrizes de maior capacidade (1 l) esterilizados com meio Z8 e rolhados, e deixadas a crescer por mais 2 ou 3 semanas. Quando estas apresentaram novo desenvolvimento, foram colocadas em balões de 6 l de capacidade esterilizados, com 4 l de meio Z8 e arejamento. No final desta fase, as culturas foram colocadas em funis de decantação, por forma a ser possível separar as colónias por sedimentação ou flutuação, num período de 24 horas. Após a separação das colónias, o material foi congelado a - 20 ° C, liofilizado e conservado num armário até posterior utilização.

A partir do momento que era obtida uma cultura pura de uma estirpe, as cianobactérias foram fotografadas, utilizando-se um sistema composto por um

microscópio óptico, Leica DMLB associado ao software Leica Qwin (Fig. 3.3.1. a 3.3.11.)

2.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

O material guardado, depois de liofilizado, foi analisado através de duas metodologias, o ELISA e HPLC.

2.3.1. QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS POR ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Princípio do Método

Este teste (Envirogard Microcystins Plate Kit), está calibrado com MCYST-LR não tóxica, a níveis equivalentes a 0,1; 0,4 e 1,6 ppb. O kit usa anticorpos policlonais que se ligam a microcistinas ou a conjugados microcistina-enzima. Estes anticorpos estão imobilizados nas paredes dos pequenos poços deste teste. As microcistinas que possam existir nas amostras competem com o conjugado microcistina-enzima por um número limitado de locais de ligação ao anticorpo.

Como os locais de ligação dos anticorpos são os mesmos em todos os poços do teste, e cada poço recebe o mesmo número de moléculas de conjugado microcistina-enzima, uma amostra que contenha uma baixa concentração de microcistinas permite a ligação dos anticorpos a muitas moléculas de conjugado. O resultado é uma solução amarelo escuro. Contrariamente uma elevada concentração de microcistinas faz com que poucas moléculas de conjugado se possam ligar aos anticorpos, resultando uma solução amarelo claro.

Os resultados obtidos são analisados espectrofotometricamente a 450nm.

Este método permite unicamente detectar a presença de, entre outras, MCYST - LR, MCYST - RR, MCYST - YR e Nodularinas, a diferentes concentrações, e não distingui-las.

Preparação das amostras

Pesou-se 20 mg de cada amostra e resuspendeu-se em 2 ml de água ultrapura, de seguida submeteu-se a amostra aos ultrasons por alguns segundos, filtrou-se 1 ml da solução para um ependorff, com filtro de 0,2 µm (Schleidher & Schuell). Seguidamente fizeram-se 2 ou 4 diluições conforme a necessidade, 10, 100, 1000 e 10000 vezes, com água ultrapura, de forma a que pelo menos um das diluições se encontrasse dentro da curva de calibração do método. De cada amostra e diluições obtidas, retiraram-se 100 µl da solução e colocou-se em cada poço do kit, realizando sempre uma réplica.

2.3.2. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS POR HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Princípio do Método

Este método tem por base a leitura cromatográfica dos elementos constituintes de uma amostra, comparando o tempo de retenção do padrão, com o tempo de retenção das moléculas a investigar.

O padrão utilizado para este trabalho foi a MCYST - LR com tempo de retenção de 16,43 minutos.

Foi utilizado um sistema de cromatografia Merck - Hitachi, com um sistema de detecção de fotodíodos (HPLC - PDA), equipado com bombas L-7100, um amostrador automático L-7200, um interface D-7000 e um detector de fotodíodos L-7450 regulado para leituras a 238 nm. A separação das microcistinas foi obtida usando uma coluna de 5 µm ODS, (sistema de cartuchos LiChroCART®250-4, Merck, KgaA, Germany). A fase móvel era composta por água Mili-Qplus e acetonitrilo, ambos contendo 0.055 % de Ácido Trifluoroacético (TFA) e uma fluxo de 1 ml/min (Lawton et al., 1994^a, Meriluoto *et al.*, 1999). O gradiente usado foi de 28% a 70% de acetonitrilo durante 30 min. O espectro de UV, para cada fracção, foi testado e as variantes de microcistinas

foram identificadas numa fase preliminar, pelas suas características face ao espectro de UV (absorvância UV λ_{\max} a 238-240 nm).

Preparação das amostras

Pesou-se 100 mg de cada amostra e resuspendeu-se em 4 ml de metanol a 50%. De seguida centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 min. Do sobrenadante obtido, foi filtrado 1 ml, com filtro 0,2 μm (Schleidher & Schuell), para frascos de HPLC.

As soluções e as amostras assim preparadas, foram seguidamente colocadas no banho de ultrasons (5 min para as amostras e 15 min para as soluções), após o que se colocaram as amostras num carroto para o injectador automático do sistema de HPLC. De cada amostra foi injectado 100 μl , em replicado.

Desta análise obtiveram-se cromatogramas que se apresentam nos resultados (Fig. 3.4.2.1 a 3.4.2.11).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste trabalho, o tratamento estatístico dos dados foi realizado segundo o Teste t de Student, de forma a detectar diferenças significativas, no conteúdo tóxico e nas dimensões celulares, das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, da Lagoa de Mira, em diferentes partes do ano.

O teste t de Student foi escolhido para o tratamento estatístico dos dados, uma vez que este teste permite a análise de duas amostras com variâncias desiguais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OCORRÊNCIA DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* NA LAGOA DE MIRA

Segundo Vasconcelos *et al.* (1993), a Lagoa de Mira, está em avançado estado de eutrofização, desenvolvendo florescências de *Microcystis aeruginosa*, durante os meses de Verão e Outono, e um estudo realizado em 1992, permitiu concluir que esta espécie foi a mais comum. Ainda nesse estudo foi verificado que 100 % das estirpes isoladas (*Anabaena flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa*), nesta lagoa eram tóxicas.

As florescências que ocorrem na lagoa de Mira são geralmente dominadas por estas duas espécies de cianobactérias. Contudo, no presente trabalho, durante o período de amostragem, não foram detectadas quaisquer florescências destas ou de outras cianobactérias. As estirpes isoladas neste trabalho, resultaram de colónias obtidas por arrasto, o que revelou a presença de *Microcystis aeruginosa*, na Lagoa de Mira.

3.2. ISOLAMENTO E CULTURA DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Neste trabalho foram isoladas estirpes de *Microcystis aeruginosa*, da Lagoa de Mira. Das colheitas de Setembro de 1999 e Junho de 2000, não foi possível a obtenção de resultados, uma vez que as colónias morreram. Nas restantes datas, Março e Maio de 2000, isolaram-se estirpes de *Microcystis aeruginosa*, com uma percentagem de sucesso de 26.6% e 37.5% respectivamente.

Microcystis aeruginosa (Kutz), é uma espécie de cianobactéria pertencente à Ordem Chroococales. Segundo Mur *et al.* (1999) esta Ordem possui organismos unicelulares de forma ovóide ou cilíndricas, podendo agregar-se em colónias irregulares. As suas colónias podem ser esféricas, ovais ou até irregulares, com células organizadas ou soltas envolvidas num envelope mucilaginoso hialino.

Komarek (1991), refere que as células desta espécie são esféricas ou ligeiramente ovais, de 3 a 5,5 µm de diâmetro, com conteúdo celular homogéneo, de cor

cinza a azul - verde, com vesículas gasosas. Dividem-se por bipartição. Ocorrem no Verão e Outono. As colónias podem ser micro ou macroscópicas, irregulares, alongadas ou lobadas e com meatos distintos quando idosas. A mucilagem forma uma vasta margem à volta das células (Tab. 3.1.).

Tabela 3.1. - Factores morfológicos usados na identificação de *Microcystis aeruginosa* (Adaptado de Komarek, 1991).

Tamanho celular	Mucilagem	Forma da colónia	Meatos
3,5-6,5 µm	Fluida e vasta 2-5-10 µm	Irregular com células distribuídas homogéneamente, alongadas e lobadas	presença

A identificação de *Microcystis aeruginosa*, no presente trabalho, foi realizada tendo por base as características das suas colónias, como acima descrito.

No presente trabalho, o tamanho celular médio, variou entre 4.69 µm e 6.45 µm, para as estirpes de Março e entre 4.58 µm e 5.46 µm, para as estirpes de Maio. As dimensões apresentadas foram obtidas efectuando-se a média de dois diâmetros por célula (Tab. 3.2.)

Tabela 3.2. - Dimensões médias celulares das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, de Março e Maio (-- valores máximos ; -- valores mínimos).

Data	Março 21/03/00								Maio 16/05/00		
	M8	M11	M12	M13	M14	M20	M22	M24	MA	MG	MH
Dimensões Médias (µm)	5.16	6.87	4.82	5.66	4.95	6.75	5.12	5.86	5.91	5.44	4.67
	5.30	6.62	4.39	5.34	5.78	6.74	5.10	6.12	5.02	4.84	4.39
	4.90	6.82	4.97	5.93	4.49	6.52	5.07	6.83	5.35	5.80	4.65
	5.12	6.72	4.35	5.62	4.92	5.17	5.26	6.84	5.48	5.54	4.84
	4.97	7.11	5.29	6.40	5.42	5.38	4.53	6.18	4.84	5.01	4.79
	4.82	7.08	3.99	5.23	5.42	6.99	5.15	5.50	5.59	4.33	5.09
	4.95	6.48	4.19	6.22	4.41	6.73	4.74	6.60	5.74	5.27	4.54
	4.15	7.05	3.94	5.93	5.26	6.03	4.61	5.26	4.73	5.00	4.47
	4.93	6.81	4.48	5.03	5.25	6.46	5.56	6.83	5.23	5.12	4.42
	4.19	6.74	4.35	5.95	4.88	6.32	6.15	5.68	4.74	4.93	4.71

Através das dimensões celulares médias, efectuadas realizou-se a análise estatística destes dados, pela elaboração de um Teste t de Student (Tab. 3.3.).

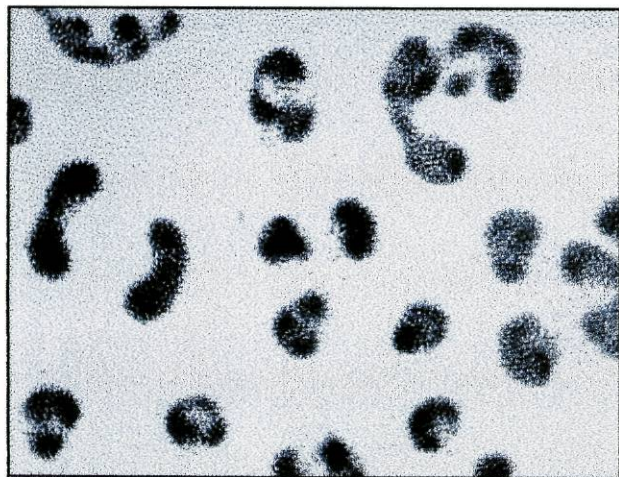
Tabela 3.3. - Valores médios (X), desvio padrão (sd) e número de observações (N), das dimensões celulares das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, de Março e Maio.

Data	Março		Maio		Nível de Significância
Parâmetro	(X ± sd)	N	(X ± sd)	N	P
Dimensão celular (µm)	5.57 ± 0.88	80	5.02 ± 0.44	30	P < 0.05

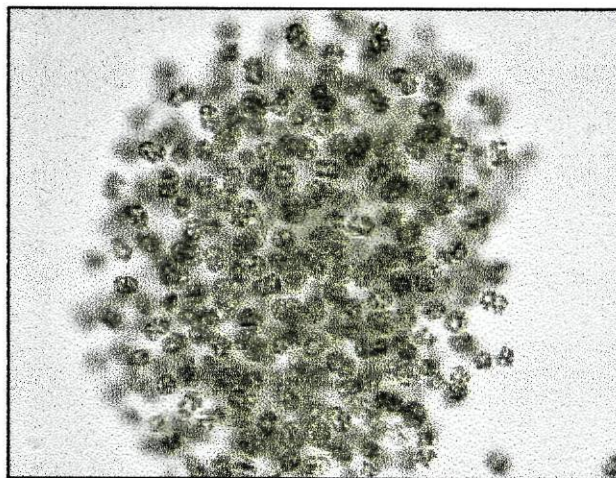
Estes resultados permitiram inferir que as células das estirpes de Março são significativamente maiores do que as células das estirpes de Maio.

Retomando a hipótese proposta por Tatsumi *et al.* (1991), poderemos considerar as estirpes de Março como pertencentes ao tipo L e as estirpes de Maio como pertencentes ao tipo S.

3.3. IDENTIFICAÇÃO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AO MICROSCÓPIO ÓPTICO.



A



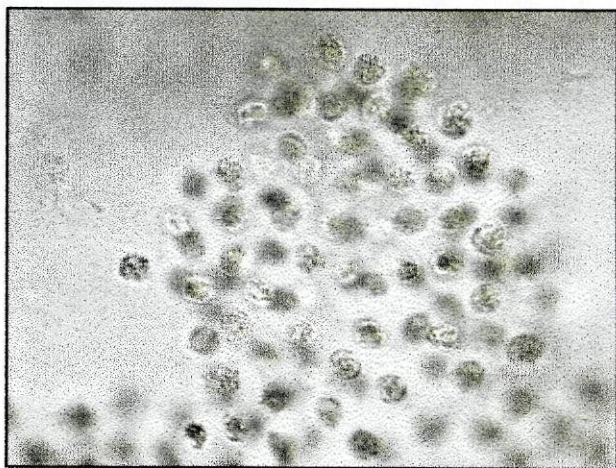
B

Figura 3.3.1. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da estirpe M8

(A - Ampliação 100x, com filtro; B - Ampliação 1000x).



A



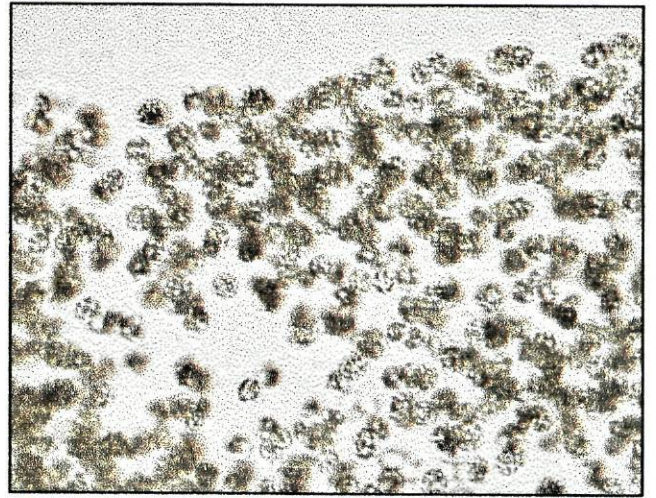
B

Figura 3.3.2. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da estirpe M11

(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).

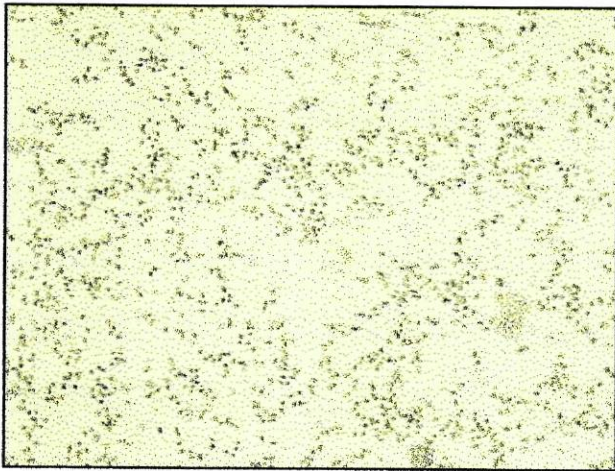


A



B

Figura 3.3.3. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da estirpe M12
(A -Ampliação 100x; B - Ampliação 1000x).



A

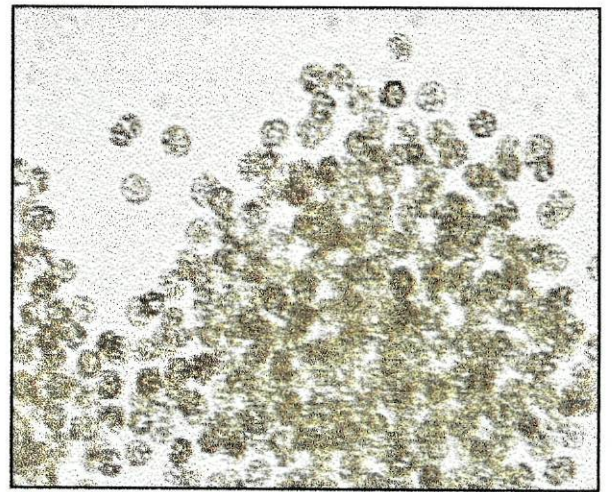


B

Figura 3.3.4. - Fotografia de colónias (A) e de algumas células (B) da estirpe M13
(A - Ampliação 100x ; B – Ampliação 1000x).

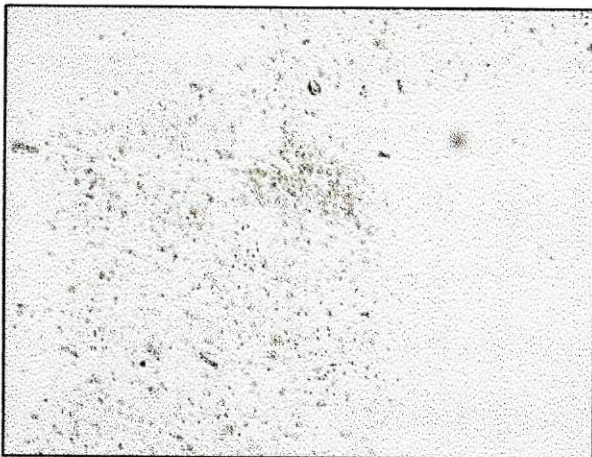


A

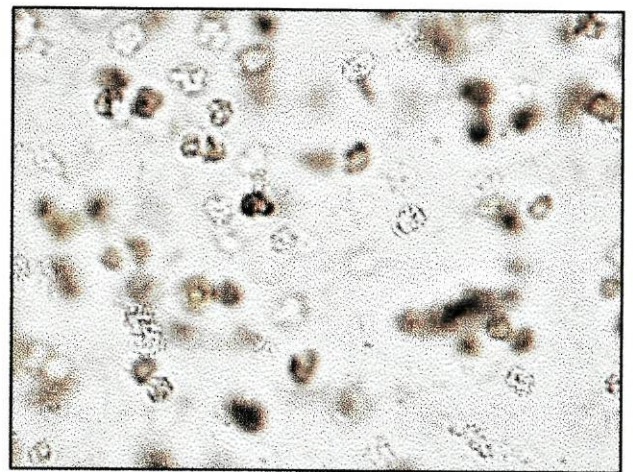


B

Figura 3.3.5. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da estirpe M14
(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).



A

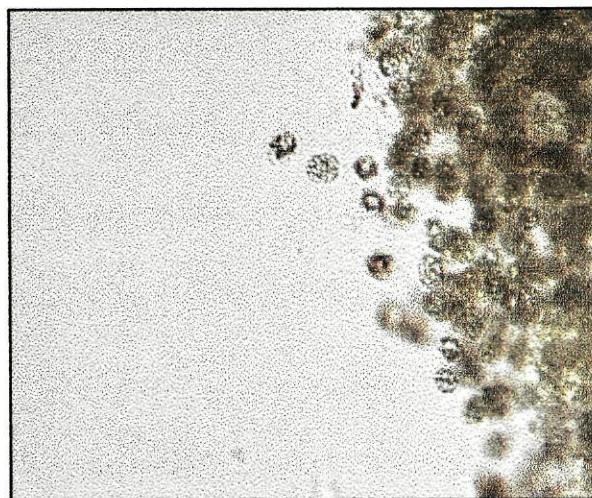


B

Figura 3.3.6. - Fotografia de colónia (A) e de células (B) da estirpe M20
(Ampliação 400x).



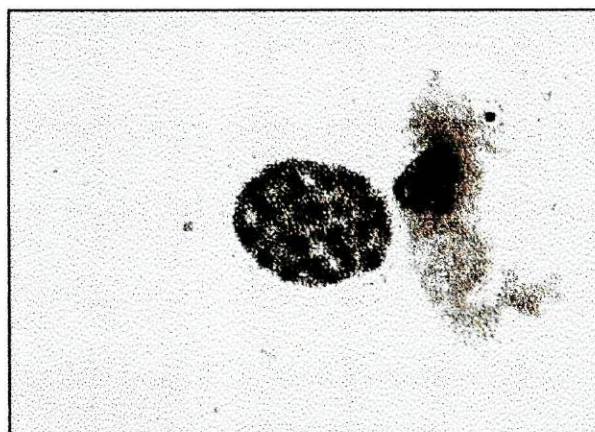
A



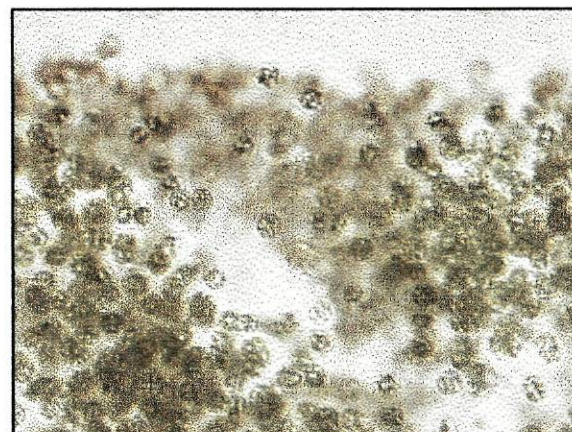
B

Figura 3.3.7. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da estirpe M22

(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).



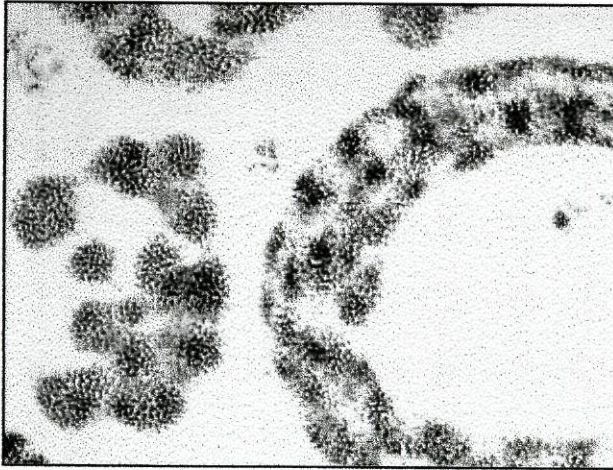
A



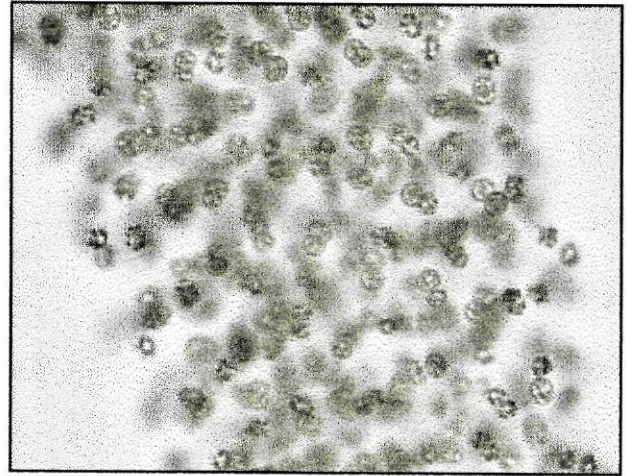
B

Figura 3.3.8. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da amostra M24

(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).

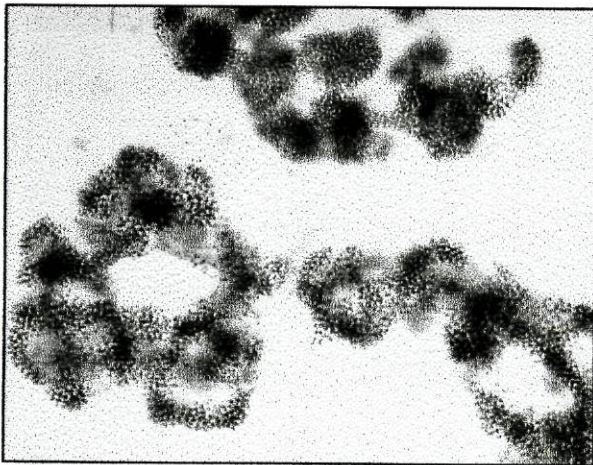


A

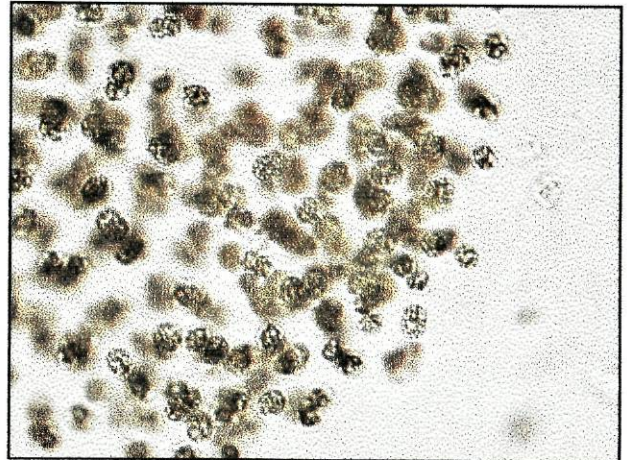


B

Figura 3.3.9. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da amostra MA
(A - Ampliação 100x, B - Ampliação 1000x).

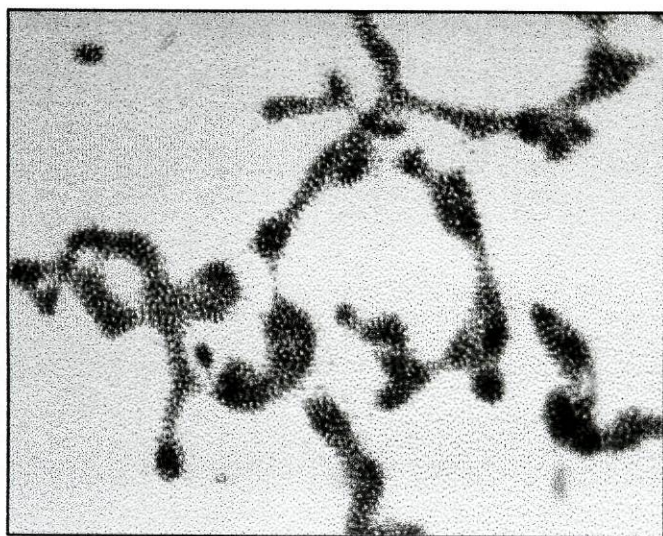


A

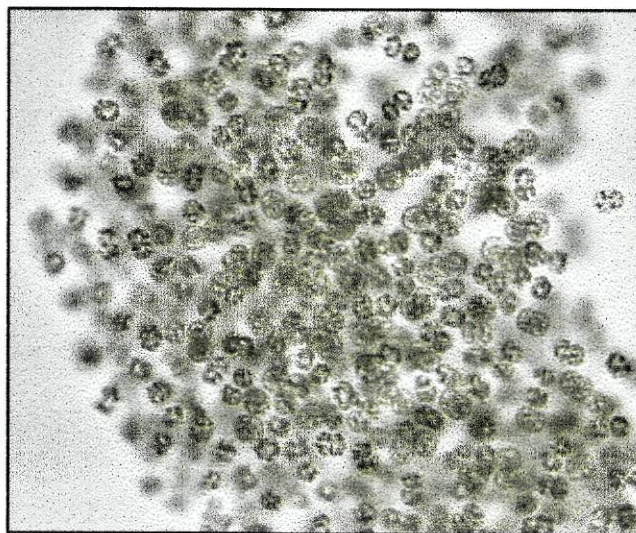


B

Figura 3.3.10. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) amostra MG
(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).



A



B

Figura 3.3.11. - Fotografia de colónias (A) e de células (B) da amostra MH
(A - Ampliação 100x ; B - Ampliação 1000x).

A comparação das colónias de todas as estirpes (A), apresentada nas figuras acima, permite verificar alguma diferença no arranjo colonial entre as estirpes de Março e de Maio. Assim, as colónias de Março (M8 - M24) apresentam-se mais circulares e organizadas, enquanto que as colónias de Maio (MA - MH), não são tão circulares revelando uma morfologia mais variada. Estas observações apoiam os dados referidos por alguns autores, que consideram *Microcystis aeruginosa*, uma espécie bastante polimórfica, no que respeita à formação das colónias.

3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Para a avaliação da toxicidade das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, usaram-se dois métodos de análise, que foram o teste ELISA e o teste HPLC, que se passam a descrever:

3.4.1. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Os testes realizados, para avaliar o conteúdo tóxico das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, permitiram verificar a presença de diversas microcistinas e identificar MCYST –LR, os resultados obtidos apresentam-se nas próximas tabelas e gráficos.

Tabela 3.4.1. - Conteúdo em microcistinas por estirpe de *Microcystis aeruginosa* em Março e Maio.

Data	Estirpes	Conteúdo em Microcistinas (µg /mg peso seco)
Março (21/03/00)	M8	0,74
	M11	0,44
	M12	0,213
	M13	1,54
	M14	0,25
	M20	0,9
	M22	0,29
	M24	1,4
Maio (16/05/00)	MA	0,26
	MG	0,84
	MH	1,12

Tabela 3.4.2. - Valor médio (X), desvio padrão (sd) e número de observações (N) do conteúdo em microcistinas das estirpes de *Microcystis aeruginosa* de Março e Maio, obtidos por ELISA (análise estatística efectuada por Teste t de Student).

Data	Março		Maio		Nível de Significância
Parâmetro	X ± sd	N	X ± sd	N	P
Conteúdo em Microcistinas (µg /mg peso seco)	0.72 ± 0.52	8	0.74 ± 0.44	3	P < 0.05

O conteúdo em microcistinas encontrado para as estirpes de *Microcystis aeruginosa*, de Março e Maio, respectivamente, são significativamente diferentes. Em Março o conteúdo de microcistinas foi significativamente inferior ao conteúdo de microcistinas de Maio.

3.4.2. HPLC

A análise de HPLC feita às diferentes estirpes isoladas da Lagoa de Mira, revelou a ocorrência de várias microcistinas, como se pode verificar pela análise dos cromatogramas que se apresentam.

3.4.2.1 CROMATOGRAMAS

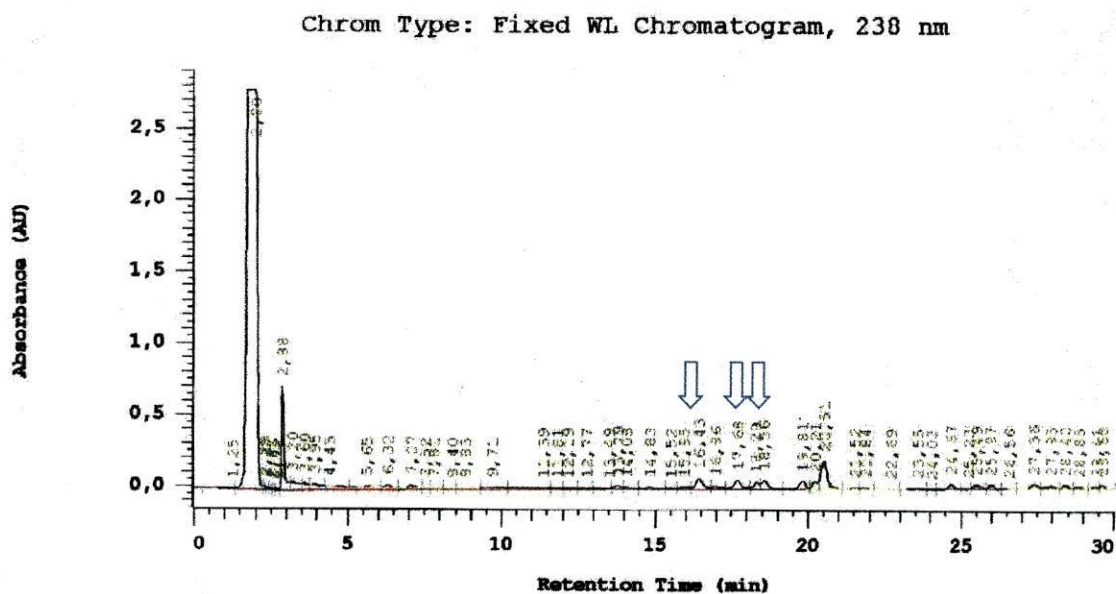


Figura 3.4.2.1. - Cromatograma da amostra M8, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (\Rightarrow - microcistinas detectadas a 238 nm).

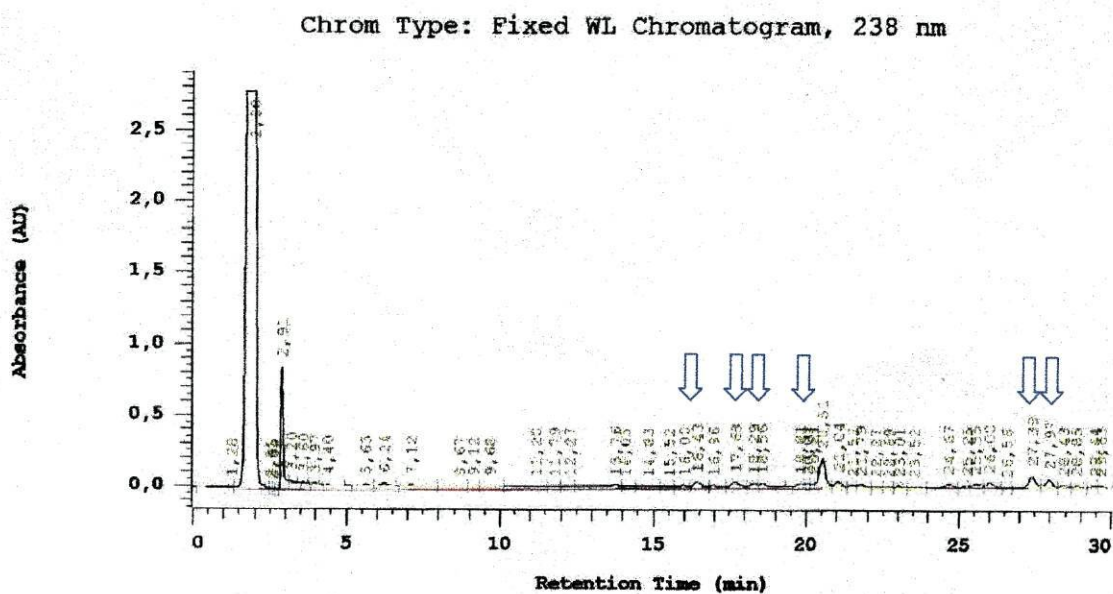


Figura 3.4.2.2. - Cromatograma da amostra M11, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (⇨ - microcistinas detectadas a 238 nm).

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 238 nm

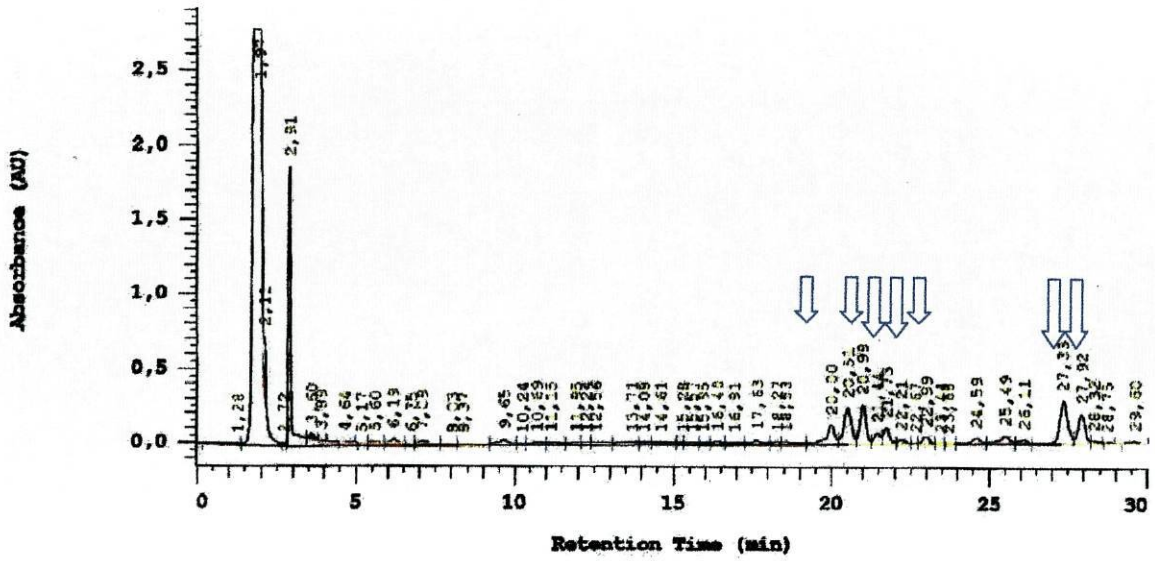


Figura 3.4.2.3. - Cromatograma da amostra M12, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (↔ - microcistinas detectadas a 238 nm).

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 238 nm

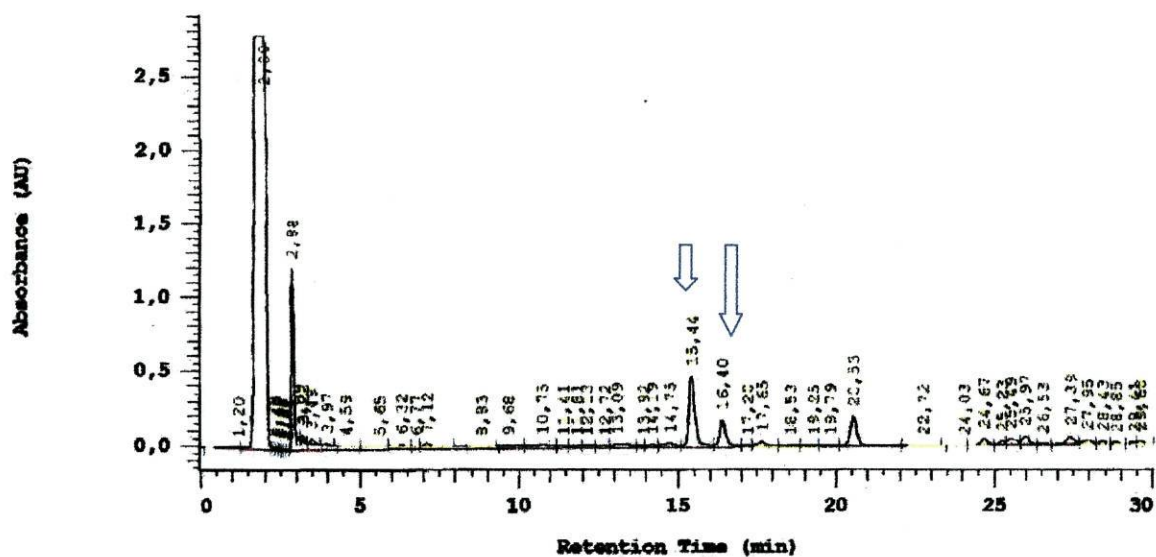


Figura 3.4.2.4. - Cromatograma da amostra M13, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (\Rightarrow - microcistinas detectadas a 238 nm).

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 238 nm

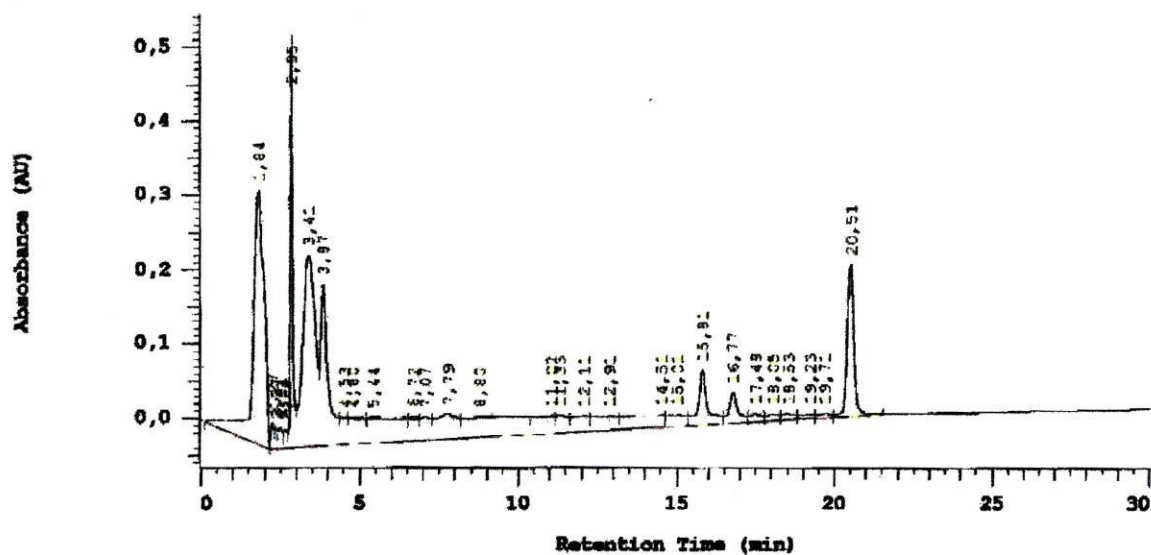


Figura 3.4.2.5. - Cromatograma da amostra M14, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos.

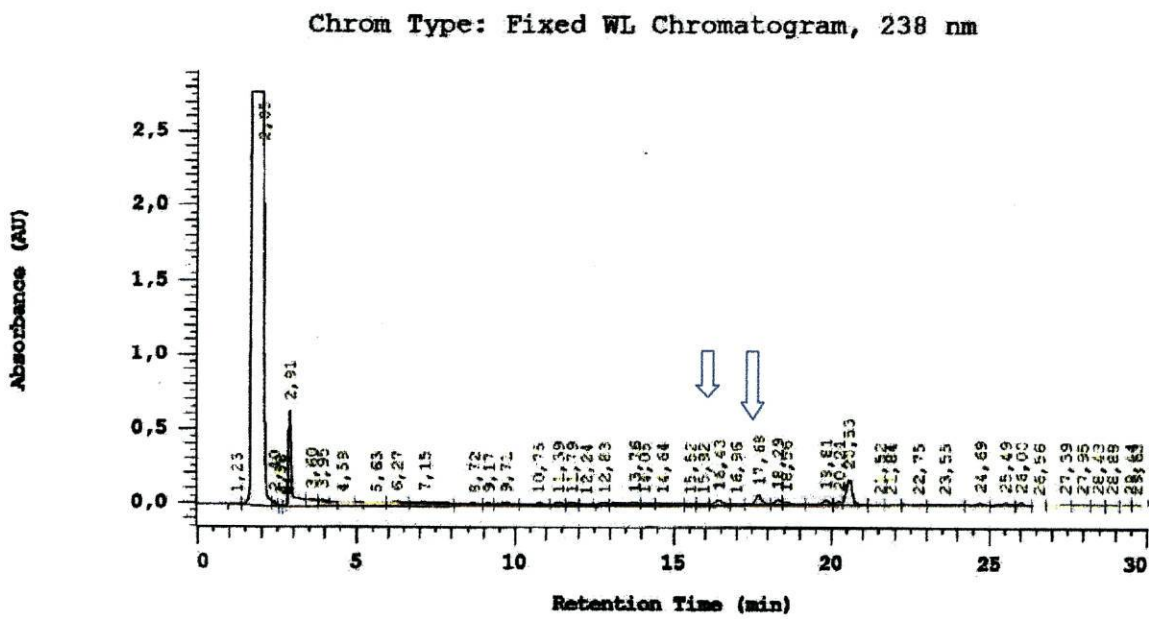


Figura 3.4.2.6. - Cromatograma da amostra M20. obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (⇨ - microcistinas detectadas a 238 nm).

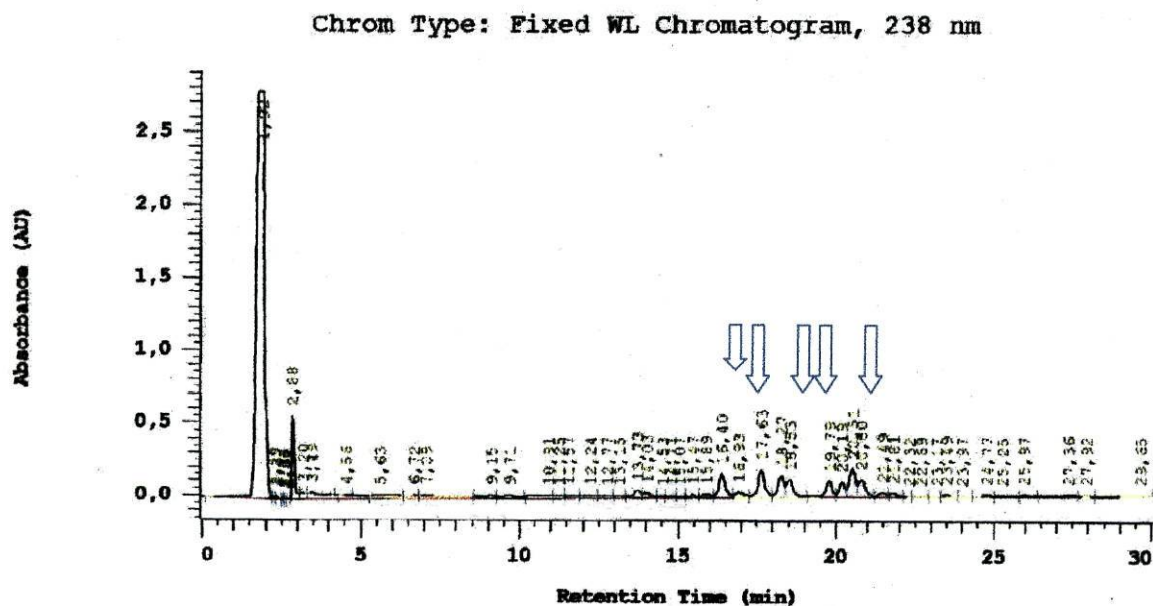


Figura 3.4.2.7. - Cromatograma da amostra M22, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (⇨ - microcistinas detectadas a 238 nm).

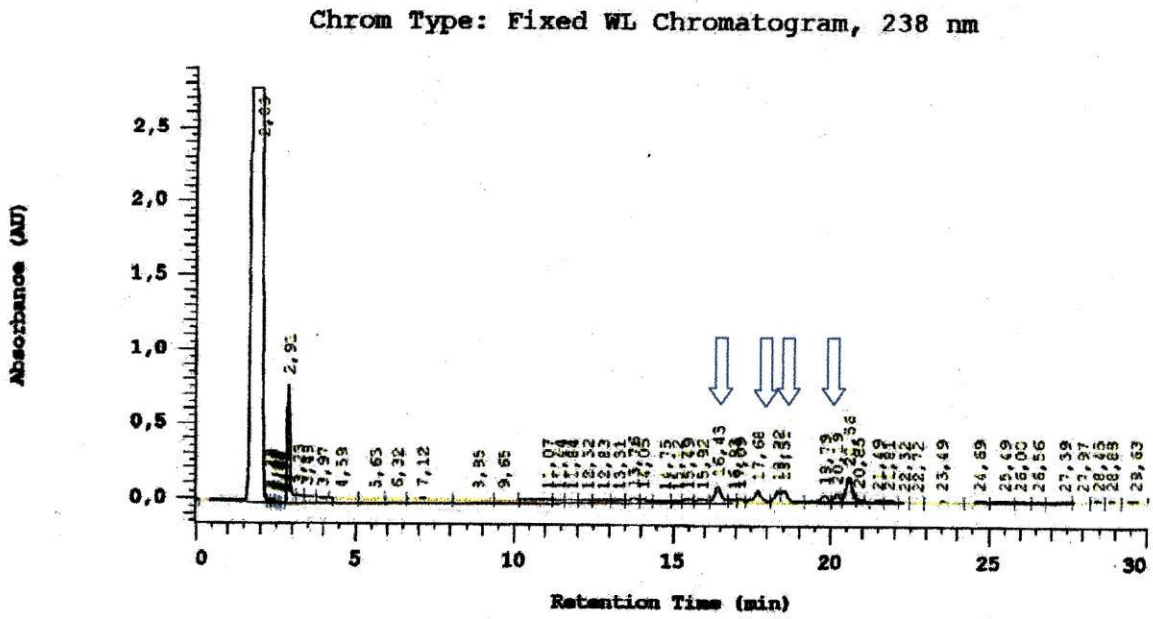


Figura 3.4.2.8. - Cromatograma da amostra M 24, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (⇨ - microcistinas detectadas a 238 nm).

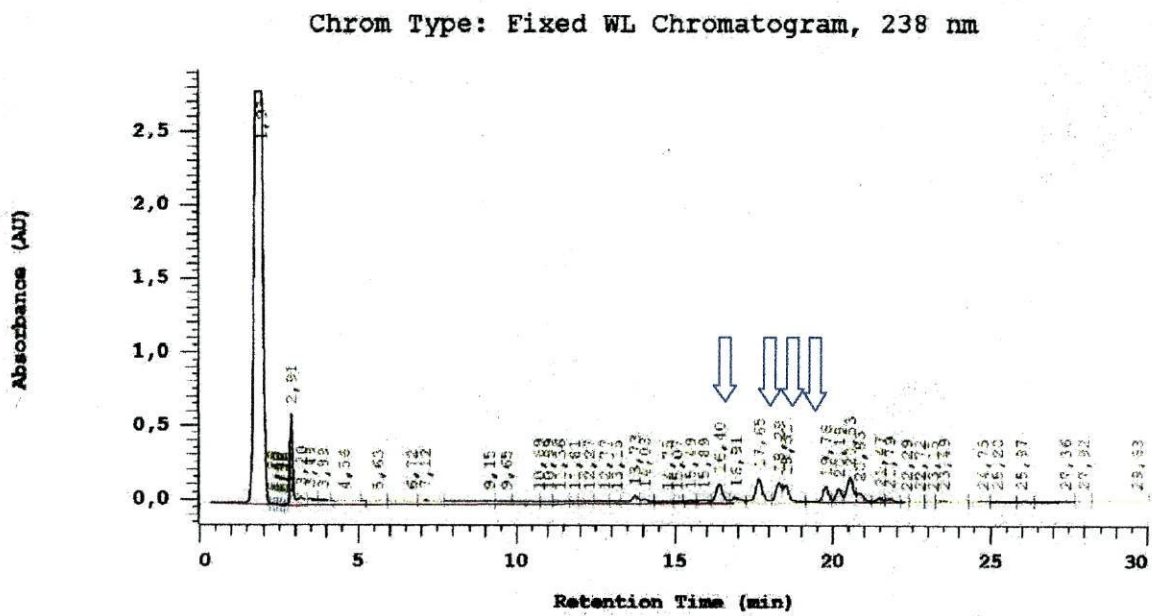


Figura 3.4.2.9. - Cromatograma da amostra MA, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (↔ - microcistinas detectadas a 238 nm).

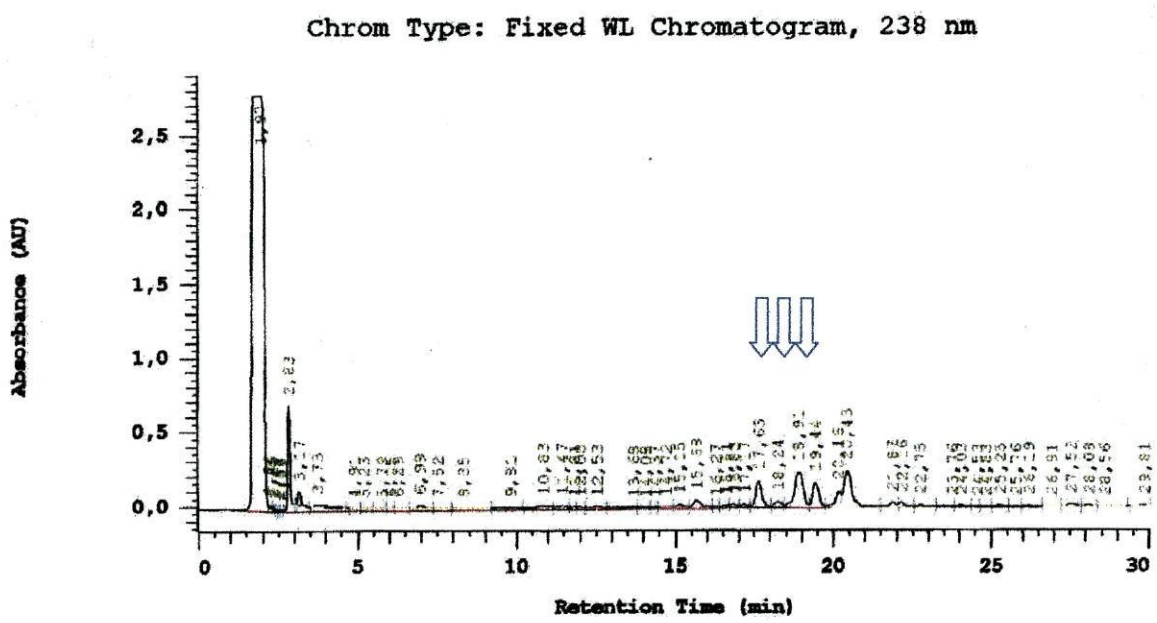


Figura 3.4.2.10. - Cromatograma da amostra MG, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (\Rightarrow - microcistinas detectadas a 238 nm).

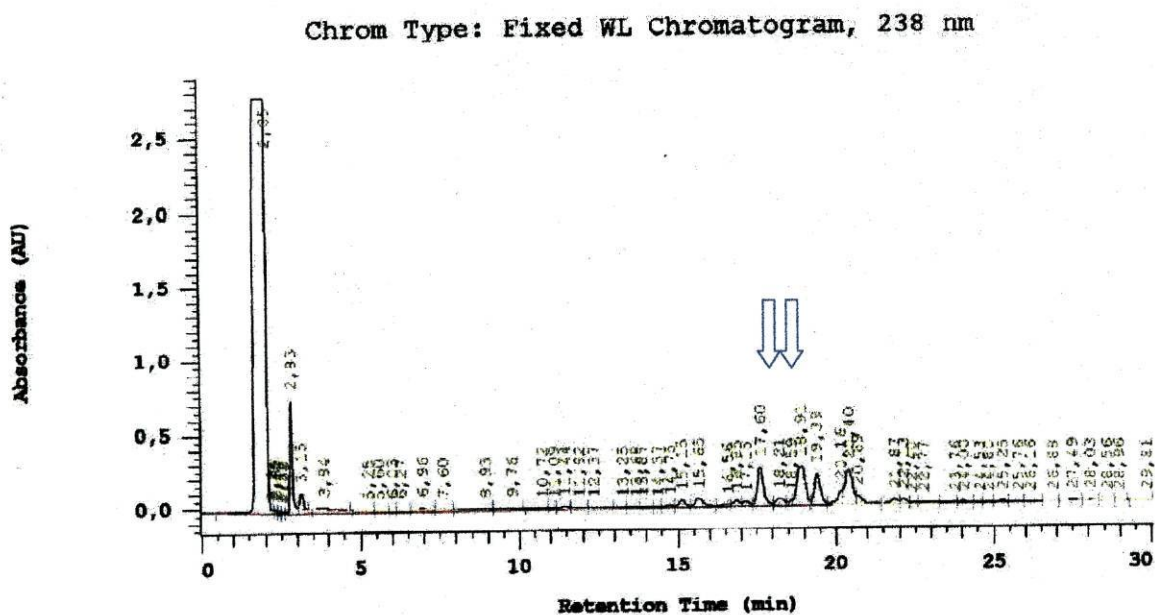


Figura 3.4.2.11. - Cromatograma da amostra MH, obtido segundo as condições referidas no Capítulo Material e Métodos (⇨ - microcistinas detectadas a 238 nm).

A MCYST - LR, foi detectada de acordo com o tempo de retenção do padrão de MCYST - LR (16,43 min), injectado nas mesmas condições.

Tabela 3.4.2.1. - Tempo de retenção das microcistinas detectadas, obtidos em função da análise dos cromatogramas, das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, de Março e Maio, respectivamente.
(- não foi identificada nenhum tempo de retenção).

Data	Março								Maio		
Estirpes	M8	M11	M12	M13	M14	M20	M22	M24	MA	MG	MH
Tempo de Retenção (min)	16.43	16.43	19.81	15.44	-	16.43	16.43	16.43	16.43	17.68	17.68
	17.68	17.68	20.99	16.43	-	17.68	17.68	17.68	17.68	18.56	18.56
	18.56	18.56	21.44				18.56	18.56	18.56	19.81	
		19.81	21.73				19.81	19.81	19.81		
		27.39	22.99				20.99				
	27.97	27.39	27.97								



Microcistinas não identificadas



Microcistina -LR

Com a análise de HPLC, todas as estirpes de *Microcystis aeruginosa*, isoladas neste trabalho, revelaram toxinas, com exceção da estirpe M14, a qual não revelou nenhum pico no cromatograma (Fig.3.4.2.5.). Pode verificar-se pela análise da tabela 3.4.2.1. que a estirpe onde se detectou maior diversidade de microcistinas foi M12, embora não tenha apresentado MCYST-LR. Verifica-se ainda que de todas as estirpes analisadas, somente três não revelaram a presença de MCYST-LR. Havendo maior incidência desta toxina, no mês de Março do que em Maio.

A estirpe M12 apresentou três microcistinas não identificadas, com tempos únicos de retenção 21.44, 21.73 e 22.99, em relação a todas as outras estirpes.

As estirpes M11 e M12 apresentaram duas microcistinas não identificadas, com igual tempo de retenção, que foram 27.39 e 27.97.

As microcistinas não identificadas, com tempos de retenção de 17.68 e 18.56, foram encontradas igualmente nas estirpes M8, M11, M22, M24, MA, MG e MH.

A microcistina não identificadas, com tempo de retenção 19.81, foi encontrada igualmente em M11, M12, M22, M24, MA e MG.

A microcistina não identificadas, com tempo de retenção 15.44, foi encontrada somente, em M13.

A microcistina não identificadas, com tempo de retenção 20.99, foi encontrada igualmente, em duas estirpes M12 e M22.

Verifica-se ainda que as estirpes M24 e MA, apesar de serem de colheitas diferentes, Março e Maio respectivamente, apresentaram uma composição em microcistinas igual, com os tempos de retenção de 16.43, 17.68, 18.56 e 19.81.

No total verificou-se a detecção de dez microcistinas não identificadas.

Nas onze estirpes estudadas, sete revelaram a presença de MCYST - LR, e oito revelaram a presença de uma microcistina não identificada, com tempo de retenção 17.68, tornando-a assim a mais comum.

Todos este resultados revelam alguma concordância com os dados obtidos por alguns autores, que indicam que apesar de muitas estirpes de cianobactérias, produzirem várias microcistinas simultaneamente, frequentemente somente uma ou duas delas, são dominantes em qualquer estirpe (Sivonen *et al.*, 1995).

Na realidade verificou-se, neste trabalho, que das várias microcistinas encontradas para cada estirpe de *Microcystis aeruginosa*, três revelaram-se dominantes, em relação à concentração correspondente, e que foram as microcistinas não identificadas, com o tempo de retenção : 15.44, 17.68 e 18.56. Estes dados encontram-se sumariados na Tabela 3.4.2.2..

Tabela 3.4.2.2. – Microcistinas Dominantes encontradas para cada estirpe de *Microcystis aeruginosa*.

ESTIRPE/ DATA	MARÇO								MAIO		
	M8	M11	M12	M13	M14	M20	M22	M24	MA	MG	MH
15.44	-	-	-	74.05%	-	-	-	-	-	-	-
MCYST – LR	42%	17%	-	26%	-	16%	23%	34%	19.4%	-	-
17.68	33.33%	19.08%	-	-	-	84.05%	29.5%	29.5%	36.54%	25.4%	41.46%
18.56	25.14%	11.68%	-	-	-	-	16.53%	25.15%	20.32%	52.09%	58.53%
19.81	-	0.41%	13.24%	-	-	-	14.63%	11.49%	18%	22.5%	-
20.99	-	-	20.66%	-	-	-	16.66%	-	-	-	-
21.44	-	-	3.13%	-	-	-	-	-	-	-	-
21.73	-	-	7.05%	-	-	-	-	-	-	-	-
22.99	-	-	2.77%	-	-	-	-	-	-	-	-
27.30	-	35.68%	32.47%	-	-	-	-	-	-	-	-
27.97	-	16.18%	20.65%	-	-	-	-	-	-	-	-

■ Microcistina dominante

Tabela 3.4.2.3. - Conteúdo Parcial e Total de Microcistinas por estirpe e data de recolha.

Data	Março								Maió		
Estirpes	M8	M11	M12	M13	M14	M20	M22	M24	MA	MG	MH
Conteúdo	0,71	0,41	1,86	6,05	0	0,11	1,78	1,09	1,41	2,00	3,06
Parcial de	0,57	0,46	2,90	2,12		0,58	2,32	0,95	2,05	4,1	4,32
Microcistinas	0,43	0,28	0,44				1,3	0,81	1,14	1,77	
(µg/mg peso seco)		0,01	0,99				1,15	0,37	1,01		
		0,86	0,39				1,31				
		0,39	4,56								
			2,90								
Conteúdo	1,71	2,41	14,04	8,17	0	0,69	7,86	3,22	5,61	7,87	7,38
Total de											
Microcistinas											
(µg/mg peso seco)											



Microcistinas não identificada



Microcistina -LR

Com os valores apresentados na Tabela 3.4.2.3. sobre a concentração em microcistinas nas diferentes estirpes de *Microcystis aeruginosa*, realizou-se a análise estatística, através do Teste t de Student, por forma a avaliar a significância da diferença de concentração encontradas nas estirpes das respectivas recolhas efectuadas (Março e Maio). Os resultados desta análise apresentam-se na Tabela 3.4.2.4..

Tabela 3.4.2.4. - Valor médio (X), desvio padrão (sd) e número de observações (N), do conteúdo em microcistinas das estirpes de *Microcystis aeruginosa* de Março e Maio, obtidos por HPLC, (análise estatística efectuada por Teste t de Student).

Parâmetro	Março (X ± sd)	N	Maio (X ± sd)	N	Nível de Significância
Conteúdo em Microcistinas (µg/mg peso seco)	4.76 ± 4.83	8	6.95 ± 1.18	3	P < 0.05

É possível, através dos resultados apresentados na tabela 3.4.2.4., concluir que as diferenças encontradas no conteúdo em microcistinas nos dois meses de recolhas, são significativas. Assim, em Março, a produção de microcistinas foi significativamente inferior à produção de microcistinas em Maio.

Ao compararmos os resultados obtidos e apresentados nas tabelas 3.4.1. e 3.4.2.3., facilmente se verifica que em ambas as análises efectuadas (ELISA e HPLC) para determinar o conteúdo em microcistinas, produzidos por estirpes de *Microcystis aeruginosa*, em Março e Maio respectivamente, que em Março o conteúdo em toxina foi significativamente menor do que em Maio. Isto poderá significar que com a aproximação de temperaturas mais elevadas, aumento do fotoperíodo e disponibilidade de nutrientes, que surge no Verão, as cianobactérias, como é esperado, intensifiquem a produção de toxinas ou simplesmente se multipliquem mais, aumentando a biomassa cianobacteriana tóxica. Ainda outra possibilidade será o aumento de estirpes tóxicas em relação a estirpes não tóxicas, porém esta hipótese é apoiada somente pelos resultados obtidos por HPLC, uma vez que se verifica, em Março, a existência da estirpe M14, que não revelou a presença de nenhuma microcistina, nesta análise. Daqui se poderia inferir a possibilidade do aumento das estirpes tóxicas em detrimento das estirpes não tóxicas, o que justificava o aumento de toxicidade das estirpes de *Microcystis aeruginosa*.

Contudo, a análise por ELISA, por ser um método de maior sensibilidade (ordem dos ng), revelou a presença de microcistinas nesta mesma estirpe (M14), assim, pode então concluir-se que na realidade todas as estirpes analisadas neste trabalho são tóxicas.

Tabela 3.4.2.5. - Comparação do conteúdo em microcistinas e em MCYST - LR, das estirpes de *Microcystis aeruginosa*, obtido por ELISA e por HPLC.

Data	Estirpes	Conteúdo em	Conteúdo em	Conteúdo em
		Microcistinas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) HPLC	MCYST-LR ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) HPLC	Microcistinas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) ELISA
Março (21/03/00)	M8	1.71	0.71	0.74
	M11	2.41	0.41	0.44
	M12	14.04	0.00	0.21
	M13	8.17	2.12	1.54
	M14	0.00	0.00	0.25
	M20	0.69	0.11	0.90
	M22	7.86	1.78	0.29
	M24	3.22	1.09	1.40
Maió (16/05/00)	MA	5.61	1.41	0.26
	MG	7.87	0.00	0.84
	MH	7.38	0.00	1.12

Ao comparar os valores de microcistinas, encontrados nas diversas estirpes de *Microcystis aeruginosa*, por ambos os métodos de análise já referidos e uma vez que a análise ELISA detecta a presença de microcistinas LR, RR, YR e nodularinas, e a análise de HPLC detecta e identifica todas as microcistinas existentes numa amostra, da comparação dos resultados obtidos por ambas as análises, pode-se afirmar que, para as mesmas estirpes, o conteúdo em MCYST - LR encontrado por HPLC, é mais

comparável ao conteúdo em microcistinas encontrado por ELISA. Verifica-se neste trabalho que, para todas as estirpes estudadas com excepção de M13, M22, e MA, a quantidade de MCYST - LR encontrada por HPLC, corresponde aproximadamente à quantidade de microcistinas encontradas por ELISA. As pequenas diferenças que se encontram por ELISA, revelam a existência de outras microcistinas além de MCYST - LR, que esta análise detecta como já referido.

A análise efectuada por HPLC revela conteúdos de microcistinas mais elevados do que para ELISA, para uma mesma estirpe, este facto resulta da análise ELISA detectar somente a presença de 4 tipos de toxinas como já referido, enquanto que por HPLC todas as toxinas diferentes, existentes numa determinada estirpe, podem ser detectadas, o que aumenta o conteúdo tóxico de uma determinada estirpe.

Vasconcelos (1995), num estudo realizado no mesmo local, obteve níveis de MCYST- LR superiores (2.7 e 4.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$), aos encontrados neste trabalho (0.11 e 1.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$), embora em relação ao total de microcistinas os valores encontrados neste trabalho tenham sido superiores (0.69 e 14.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$) aos encontrados por este autor (3.3 e 5.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Estes dados permitem verificar um aumento de microcistinas total, na Lagoa de Mira, em relação a anos anteriores, muito embora uma das microcistinas considerada dominante, MCYST-LR, o não tenha sido, durante o período deste estudo.

A análise da tabela 3.4.2.2., permite verificar que a estirpe M12 foi a que apresentou maior toxicidade, pelo conteúdo de microcistinas detectado, embora não tenha revelado a presença de MCYST - LR. A estirpe que apresentou maior quantidade de MCYST - LR em relação ao total do conteúdo tóxico, foi M8 (42%).

4. CONCLUSÕES

- A realização deste trabalho demonstrou que o ecossistema estudado, Lagoa de Mira, continua a apresentar espécies tóxicas de cianobactérias, o que representa um risco para a saúde dos organismos que dela dependem, incluindo o Homem.
- O presente estudo permitiu verificar, em conformidade com dados apresentados por outros autores, que *Microcystis aeruginosa*, não aparece na Lagoa somente nos meses de Verão, uma vez que foi encontrada nos meses em que se efectuaram as colheitas e que foram Março e Maio.
- Os dados recolhidos neste trabalho indicam que *Microcystis aeruginosa* se mantem na Lagoa de Mira, mesmo durante os meses de Inverno, sobrevivendo provavelmente no fundo, à custa dos hidratos de carbono elaborados por fotossíntese intensa durante o Verão. Estes dados vêm reforçar as conclusões obtidas por Vasconcelos *et al.* (1993), que num estudo efectuado nesta Lagoa, verificou que esta cianobactéria existia neste ecossistema, durante os meses de Inverno.
- Contrariamente a alguns estudos efectuados na Lagoa de Mira, o presente trabalho permitiu identificar a existência somente de *Microcystis aeruginosa*, não se tendo detectado a presença de *Anabaena flos-aquae*.
- As análises feitas por ELISA e por HPLC, revelaram a presença de toxinas para todas as estirpes isoladas da Lagoa de Mira.
- Para a identificação das microcistinas não identificadas, encontradas neste estudo, ter-se-ia de recorrer ao uso de outros padrões de microcistinas, para HPLC ou à análise do seu peso molecular.

- Contrariamente a outros estudos efectuados nesta lagoa, a toxina MCYST – LR, não foi dominante, no presente estudo. Outras três microcistinas não identificadas se revelaram dominantes.
- Pelos resultados obtidos por ambos os métodos de avaliação de toxicidade, usados neste trabalho, pode concluir-se que estes se complementam e como tal em estudos de avaliação de toxicidade , quando se pretende a avaliação da totalidade tóxica de uma determinada amostra, recomenda-se o uso de HPLC, pois o uso de ELISA para esses casos poderá subestimar os dados. Porém quando se pretende uma análise mais rápida da presença de algumas toxinas especialmente de MCYST – LR, poderá ser realizado o teste ELISA. A situação ideal, será poder realizar ambos os testes, em virtude de complementar a informação pretendida.
- A análise da tabela 2.2., permite verificar que estavam estabelecidas as condições necessárias ao desenvolvimento cianobacteriano, especialmente no respeitante às condições de temperatura. O nível de oxigénio acima dos 100%, é indicativo de actividade fotossintética, por parte da massa cianobacteriana.
- A análise da tabela 2.1. permite verificar que das estirpes isoladas nas colheitas de Setembro de 1999 e Junho de 2000, não foi possível obter nenhuma cultura. As colónias morreram, possivelmente em consequência da mudança do meio natural para as condições laboratoriais. Como já foi referido, as mudanças na temperatura, intensidade luminosa e pH, podem alterar o comportamento e condicionar a sobrevivência das estirpes, nessas condições.
- Pode-se concluir com os resultados obtidos, que *Microcystis aeruginosa* foi a espécie dominante na Lagoa de Mira, durante o período do presente estudo.
- A Lagoa de Mira, oferece boas condições ao desenvolvimento de cianobactérias e durante a maior parte do ano, não se limitando aos meses de Verão. Estas condições

são ainda inflacionadas pelo aporte de nutrientes, devido às escorrências dos terrenos que a circundam, ao uso desmedido de engodo para a pesca e ao despejo de águas pluviais não tratadas.

- Como tal um plano de monitorização que vise o tratamento das águas pluviais, o controlo do uso de engodo usado na pesca, a colocação de barreiras naturais ou artificiais à volta da lagoa e a diminuição do uso de adubos nos campos, deverá ser implementado, por forma a diminuir ou anular o aparecimento de florescências tóxicas e assim proteger as populações que usam a Lagoa de Mira.
- Os objectivos propostos foram atingidos, embora a detecção de possíveis diferenças, quer em termos quantitativos, quer do perfil de microcistinas, foi realizado somente em dois meses, ao contrário do inicialmente pretendido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carmichael, W.W., 1997. The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research*. 27 : 211 – 256.

Carmichael, W.W. ; Hochn, R. C. & Hrudey, S.E., 1996. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins : A Resource Guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. USA.

Dyson, N., 1999. Towards a quantitative definition of perfection in chromatographic analyses. *Journal of Chromatography*. 868 (2000) : 305 – 312 .

Falconer, I. ; Bartram, J.; Chorus, I.; Kuiper-Goodman, T. ; Utkilen, H. ; Burch, M. ; Codd, G. A., 1999. Safe Levels and Safe Practices. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus & Jamie Bartram (ed.). London – New York.

Ferreira, F. M. B., 1994. Caracterização Bioquímica de Cianotoxinas Produzidas por duas Espécies de Cianobactérias (*Microcystis aeruginosa* Kutz. e *Aphanizomenon flos – aquae* (L.) Ralfes) Provenientes da Albufeira de Crestuma – Lever (Rio Douro). Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada Apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Henriksen, P., 1996 . Toxic cyanobacteria / blue-green algae in Danish fresh waters. Ph.D. thesis. Botanical institute. University of Copenhagen.

Harada, K. ; Kondo, F. & Lawton, L., 1999. Laboratory Analysis of Cyanotoxins. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus & Jamie Bartram (ed.). London – New York.

Hindák, F. & Moustaka, M. T., 1988. Planktic cyanophytes of lake Volvi, Greece. *Archiv für Hydrobiologie* . 80 (1-4) : 497 - 528.

Jochimsen, E. M. ; Carmichael, W.W. ; An, J.; Cardo, D.M. ; Cookson, S.T. ; Holmes, C.E.M. ; Antunes, M.B. ; Filho, D.A.M. ; Lyra, T.M. ; Barreto, V. ; Azevedo, S.M.F.O. & Jarvis, W.R., 1997. Microcystins Toxicity in Hemodialysis Patients. Liver Failure and Death Following Exposure to Microcystin Toxins at a Hemodialysis in Brazil. *Hospital Infections Program*. Center for Disease Control and prevention. Georgia.

Kohl, J.G ; Börner, T. ; Henning, M. ; Schwabe, W. ; Weihe, A., 1988. Plasmid content and differences in ecologically important characteristics of different strains of *Microcystis aeruginosa*. *Archiv für Hydrobiologie* . 80 (1-4) : 195 - 201.

Komárek, J., 1991. A review of water – florescência forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Algological Studies* . 64 : 115 – 127.

Kováčik, L., 1988. Cell division in simple coccal cyanophytes . *Archiv für Hydrobiologie* . 80 (1-4) : 149-190.

Lawton, L. A.; Edwards, C. ; Codd, G. A., 1994. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. *Analyst*. 119 : 1525 – 1530.

Lindholm , T. ; Eriksson , J.E. ; Meriluoto, J.A., 1989 . Toxic cyanobacteria and water quality problems – Examples from a eutrophic lake on Åland, South West Finland. *Water Research*. 23 (4) : 481- 486.

Mur, L. R. ; Skulberg, O. M. & Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the Environment. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus & Jamie Bartram (ed.). London – New York.

Park, H.; Namikishi, M.; Brittain, S.M.; Carmichael, W.W. & Murphy, T., 2001. [D-Leu¹] microcystin – LR, a new microcystin isolated from waterflorescência in a Canadian prairie lake. *Toxicon*. 39 (6) : 855-862.

Pereira, E. G. M., 1998. Avaliação do Estado de Eutrofização do Rio Tâmega (troço Amarante - Entre-os-Rios) Ocorrência de Cianobactérias Tóxicas. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada Apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Sivonen, K. & Jones G., 1999 . Cyanobacterial Toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus & Jamie Bartram (ed.). London – New York.

Tatsumi, K. ; Watanabe, M. F. & Watanabe, M., 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Algological Studies* . 64 : 129-140.

Vasconcelos, V. M., Campos, T., Amorim A. & Soares A.M.V.M., 1993. Toxicidade de estirpes de cianobactérias isoladas a partir das lagoas das Braças, Vela e Mira. *Boletim UCA* . 1 : 193-201.

Vasconcelos, V. M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters . *Archiv für Hydrobiologie* . 130 (4): 439-451.

Vasconcelos, V. M., 1995. Toxicologia de Cianobactérias. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. FCUP.

Vasconcelos, V. M.; Sivonen, K. ; Evans, W. R. ; Carmichael, W. W. & Namikoshi, M., 1996 . Hepatotoxic Microcystin Diversity in Cyanobacterial Florescências Collected in Portuguese Freshwaters. *Water Research*. 30 : 2377-2384.

Vasconcelos, V. M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32: 249-254.

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

Yoshio, U. ; Nagata, S. ; Tautsumi, T. ; Hasegawa, A. ; Yoshida, F. ; Suttajit, M. ; Mebs, D. ; Pütsh, M. & Vasconcelos, V., 1996. Survey of Microcystins in Environmental Water by Highly Sensitive Immunoassay Based on Monoclonal Antibody. *Natural Toxins*. 4 : 271-276.