

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

**Estudo da influência das concentrações de N e P sobre o
desenvolvimento de cianobactérias em cultura mista**

Catarina Luzio Nunes da Silva

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente,

Perfil Engenharia Sanitária

Orientadora: Prof^ª Doutora Maria Conceição Raimundo Santos

Lisboa, 2008

- **Agradecimentos**

Este trabalho só foi possível graças ao contributo de muitas pessoas a quem quero prestar o meu reconhecido agradecimento.

Em primeiro lugar à minha orientadora Prof^a Doutora Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos, pela oportunidade que me deu em realizar esta dissertação, e pela sua orientação, ajuda e sugestões nas alturas mais problemáticas.

À Prof.^a Doutora Paula Sobral e restantes membros do Grupo de Qualidade do Ambiente do DCEA, pela cedência e autorização do uso do seu laboratório e equipamento.

À Eng. Maria José Correia pelo tempo dispensado e a atenção.

À D. Luísa, pela disponibilidade sempre além das horas de saída, pela paciência e pelas conversas de fim de tarde, e à D. Adélia, pelas palavras de força mesmo em horas de maior desânimo.

Ao Filipe e à Cláudia, pelas explicações e ajuda sempre que solicitada na realização de algumas metodologias laboratoriais.

Aos meus companheiro de laboratório, pela companhia, pela ajuda e apoio, pelos bons momentos e principalmente pelos mais difíceis de ultrapassar.

Ao meu Pai, um agradecimento enorme deste “Jacaré”. Pela paciência e compreensão, pelas pressões mas essencialmente, por teres estado sempre lá para me apoiar.

Aos meus colegas e amigos, porque não me deixam ficar mal. Obrigada por toda a camaradagem, companheirismo, apoio e compreensão, mais até do que a que julgam possível.

- **Dedicatórias**

À minha Mãe. Obrigada por estares sempre aqui.

À minha família.

- **Resumo**

Ao longo de 40 anos, muitos trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos no âmbito do tema da eutrofização e desenvolvimento de biomassa fitoplanctónica. Em todos eles, eram sugeridos factores responsáveis, desde a latitude, luz, temperatura, mistura da coluna de água e os *inputs* de nutrientes.

Toda a controvérsia gerada em torno da eutrofização, levou a que a inércia adoptada em situações de risco induzisse a degradação de muitos sistemas aquáticos. É quando, além da degradação estética, os problemas começam a surgir, que se compreende a necessidade de que surjam medidas de gestão e requalificação das lagoas e bacias hidrográficas. A tendência para a ocorrência de florescências de organismos como cianobactérias, implica a necessidade de maiores cuidados nos usos das massas de água, principalmente ao nível da produção de água para consumo humano e do uso recreativo.

Uma boa gestão, implica um conhecimento aprofundado do comportamento destes organismos. Este trabalho, apresenta as respostas de organismos recolhidos em florescências naturais, na Lagoa das Furnas – ilha de S. Miguel (Açores) em meios com diferentes teores de azoto. As diferenças entre os resultados, permitem retirar algumas conclusões sobre as condições preferenciais ao seu desenvolvimento.

De um modo geral, as culturas comportaram-se da forma esperada, desenvolvendo-se mais com doses de azoto mais elevadas. Este desenvolvimento foi verificado tanto pelo aumento das partículas ao longo de todo o ensaio, mas também pelos valores de pigmentos registados no fim deste.

Por outro lado, o facto do azoto ter sido adicionado sob a forma amoniacal ou de nitratos, permite concluir que os organismos presentes nas florescências preferem assimilar as formas azotadas que impliquem um menor consumo energético. Daí que se tenham verificado desenvolvimentos mais significativos em meios em que foi adicionado azoto amoniacal.

O facto de ser tratar de um trabalho baseado nas condições de desenvolvimento de organismos vivos, era de esperar alguma imprevisibilidade dos comportamentos. Sendo assim, será recomendável aprofundar o conhecimento das reacções dos organismos em cultura mista para doses diferentes de azoto, assim como a realização de ensaios em que para uma dose de N fixa, se façam variar as concentrações de P.

- **Abstract**

Over 40 years, many studies have been developed under the theme of eutrophication and development of phytoplanktonic biomass. All of them suggested responsible factors, since the latitude, light, temperature, mixing of the water column and inputs of nutrients.

The controversy beyond the eutrophication, which led to the inertia adopted in situations of risk, induced the degradation of many aquatic systems. That is when, besides the aesthetic degradation, problems begin to arise and is understood the need for measures that arise from management and requalification of lakes and river basins. The trend for the occurrence of *blooms* from bodies such as cyanobacteria, implies greater care in the use of water bodies, especially at the level of production of drinking water and recreational use. A good management, requires thorough knowledge of these bodies' behaviour. This paper presents the responses of collected organisms, from natural *blooms*, in Lagoa das Furnas - São Miguel Island (Azores), in media with different levels of nitrogen. The differences between the results, allow the drawing of some conclusions about the favourable conditions for its development.

Generally, the crops behaved in expected ways, developing itself more with higher nitrogen doses. This development was verified both by the increase of particles throughout the test and the values of pigments recorded at the end of this.

Furthermore, the addition of nitrogen in the form of ammonia or nitrates, allows the conclusion that the organisms present in *blooms* prefer to assimilate nitrogen forms, involving a lower energy consumption. Therefore, there have been more significant developments in the media where ammoniacal nitrogen was added. Since the work is based on the development of living organisms, it was expected some unpredictability.

Therefore, it is recommended a deeper knowledge of the organisms' reactions in mixed culture, to different doses of nitrogen, as well as the holding of trials in which for a dose of N established, varies the concentrations of P.

- **Acrónimos e Símbolos químicos**

0,5NH₄ – Cultura com adição de 0,5mg de NH₄/L

0,5NO₃ – Cultura com adição de 0,5mg de NO₃/L

1NH₄ - Cultura com adição de 1mg de NH₄/L

1NO₃ – Cultura com adição de 1mg de NO₃/L

2,5NH₄ – Cultura com adição de 2,5mg de NH₄/L

2,5NO₃ - Cultura com adição de 2,5mg de NO₃/L

AEL - Área Experimental de Lagos

C - Carbono

CID - Carbono inorgânico dissolvido

Cl_a – Clorofila-*a*

CO₂ – Dióxido de carbono

ETA - Estação de tratamento de água

EUA - Estados Unidos da América

HPO₄²⁻ - Fosfato

H₂S - Sulfureto de hidrogénio

H₃PO₄ – Ortofosfato

HCl - Ácido clorídrico

HCO₃ - Bicarbonato

HPLC - Cromatografia líquida de alta precisão

IBP - Programa Biológico Internacional

K₂HPO₄ - Ortofosfato dipotássico de hidrogénio

KH₂PO₄ - Ortofosfato di-hidrogenio de potássio

MCC - Multisizer™ 3 COULTER COUNTER®

N - Azoto

N – NO₂ - Nitrito

N - NO₃ - Nitrato

N- NH₄ – Azoto amoniacal

N₂ - Azoto molecular

NaCl - Cloreto de sódio

NaNO₃ – Nitrato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NH₃ - Amoníaco

OCDE - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico

OMS - Organização Mundial de Saúde

P – Fósforo

pH - Potencial hidrogeniónico

PO₄³⁻ - Ortofosfato

PT – Fósforo total

T – Testemunha, Sem adição de azoto

TSI – Índice de Estado Trófico

UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas

Índice de matérias

1. Introdução	1
2. Eutrofização e florescências de cianobactérias	7
2.1. Eutrofização	7
2.2. Florescências de cianobactérias	19
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Amostragem e preparação das amostras para ensaio	36
3.2. Ensaio de crescimento de cianobactérias em cultura mista	36
3.2.1. Preparação do meio de cultura (Meio Hoagland)	37
3.2.2. Inoculação	38
3.2.3. Adição de nutrientes	38
3.2.4. Acompanhamento do crescimento das culturas	39
3.2.5. Determinações complementares	40
3.2.6. Determinação do pH	43
4. Resultados	44
4.1. Concentração de partículas em suspensão	44
4.2. Clorofila- <i>a</i> e feopigmentos	47
4.3. Formas de fósforo	50
4.4. Formas de azoto	55
5. Conclusões	60
6. Referências Bibliográficas	62

Índice de Figuras

Figura 1 – Imagem de satélite da ilha de S. Miguel, Açores	3
Figura 2 - Esquema do perfil vertical de estratificação de um lago	7
Figura 3 - Diferenças entre a eutrofização de carácter natural e artificial (ou social)	9
Figura 4 - Ciclo do azoto	15
Figura 5 - Ciclo do fósforo	16
Figura 6 - Esquema da parede celular de uma célula <i>Gram</i> Negativa	20
Figura 7 - Esquemas de espécies de cianobactérias	22
Figura 8 – Esquema de ocorrência de florescências de cianobactérias: Suas causas e consequências	26
Figura 9 – Concentração de partículas (part./mL) nas culturas com adição de azoto amoniacal	45
Figura 10 - Concentração de partículas (part./mL) nas culturas com adição de nitratos	45
Figura 11 - Comparação da densidade celular no último dia (part./mL) com as concentrações dos pigmentos (mg/m ³) – Culturas com adição de azoto amoniacal	48

Figura 12 - Comparação da densidade celular no último dia (part./mL) com as concentrações dos pigmentos (mg/m ³) – Culturas com adição de nitratos	48
Figura 13 – Correlação entre a concentração (part./mL) de partículas em suspensão e a concentração de clorofila- <i>a</i> (mg/m ³) registadas no final das culturas	49
Figura 14 – Comparação da densidade celular máxima (part./mL) com as concentrações das formas de fósforo (µg/L) disponíveis no final dos ensaios com adição de azoto amoniacal	51
Figura 15 - Comparação da densidade celular máxima (part./mL) com as concentrações das formas de fósforo (µg/L) disponíveis no final dos ensaios com adição nitratos	51
Figura 16 – Remoção percentual (%) de fósforo solúvel nas culturas com adição de azoto na forma amoniacal e de nitratos	52
Figura 17 – Remoção percentual (%) de ortofosfatos nas culturas com adição de azoto na forma amoniacal e de nitratos	52
Figura 18 - Correlação entre a remoção de P solúvel e Ortofosfatos (%) e a concentração de clorofila- <i>a</i> (mg/m ³) registada no final das culturas	53
Figura 19 - Correlação entre a remoção de P solúvel e Ortofosfatos (%) e a concentração máxima de partículas (part./mL) em suspensão	53
Figura 20 - Relação entre a concentração máxima de partículas (part./mL) e o fósforo na forma particulada (µg/L)	54
Figura 21 - Comparação dos teores de clorofila- <i>a</i> produzida (mg/m ³) com o fósforo (µg/L) particulado	55
Figura 22 – Remoção percentual (%) de azoto amoniacal	55
Figura 23 – Remoção percentual (%) de nitratos	56
Figura 24 – Relação entre as formas de azoto removidas (mg/L) com a concentração de clorofila- <i>a</i> (mg/m ³)	57
Figura 25 - Relação entre as formas de azoto removidas (mg/L) com a concentração de partículas em suspensão (part./mL)	57
Figura 26 – Produção de azoto orgânico (mg/L)	58
Figura 27 - Correlação entre azoto orgânico produzido (mg/L) e a concentração de clorofila- <i>a</i> (mg/m ³) registada no final das culturas	59
Figura 28 - Correlação entre azoto orgânico produzido (mg/L) e a concentração máxima de partículas (part./mL) registada	59

Índice de Quadros

Quadro 1 – Caracterização da Lagoa das Furnas	4
Quadro 2 – Relação entre o TSI e o estado trófico	11
Quadro 3 – Composição do Meio Hoagland	37
Quadro 4 - Quadro resumo do ensaio realizado	39

Quadro 5 - Concentração de partículas nos diferentes ensaios.	44
Quadro 6 – Teores de Clorofila- <i>a</i> e Feopigmentos	47
Quadro 7 – Concentração de Clorofila – <i>a</i> por unidade de biomassa	50

Índice de Equações

(1) Determinação do teor de clorofila- <i>a</i>	41
(2) Determinação do teor de Feopigmentos	41

Índice de Anexos

Anexo I – Composição do Meio BG 11 (Rippka <i>et al.</i> , 1979)	69
Anexo II – Resumo dos ensaios	70
Anexo III – Comportamento das culturas ao longo do tempo	71
Anexo IV – Correlação entre parâmetros avaliados	75

Índice de Quadros

Quadro A. 1 - Composição do Meio BG 11 utilizado	69
Quadro A. 2 - Composição da solução de metais em concentrações vestigiais	69
Quadro A. 3 - Quadro resumo dos ensaios	70

Índice de Figuras

Figura A. 1 - Comportamento do ensaio Testemunha	71
Figura A. 2 - Comportamento do ensaio com adição de 0,5 mg/L de azoto amoniacal	71
Figura A. 3 - Comportamento do ensaio com adição de 1 mg/L de azoto amoniacal	72
Figura A. 4 - Comportamento do ensaio com adição de 2,5 mg/L de azoto amoniacal	72
Figura A. 5 - Comportamento do ensaio com adição de 0,5 mg/L de nitratos	73
Figura A. 6 - Comportamento do ensaio com adição de 1 mg/L de nitratos	73
Figura A. 7 - Comportamento do ensaio com adição de 2,5 mg/L de nitratos	74
Figura A. 8 - Correlação entre o fósforo particulado produzido ($\mu\text{g/L}$) e a concentração de clorofila- <i>a</i> (mg/m^3) registada no final das culturas	75
Figura A. 9 - Correlação entre o fósforo particulado produzido ($\mu\text{g/L}$) e a concentração máxima de partículas (part./mL) registada	75

1. Introdução

A água é um elemento essencial a todos organismos e em todos os ecossistemas. Ainda que as cianobactérias se caracterizem por povoarem qualquer tipo de habitat, é nos sistemas aquáticos que elas são mais frequentes (Chorus e Bartram, 1999). Tendo em consideração que a ocorrência de *blooms* é cada vez mais habitual, inclusive em períodos de Inverno, justifica-se a necessidade de avaliação das condições favoráveis ao desenvolvimento excessivo de fitoplancton. A Lagoa das Furnas é um exemplo, à escala regional, de um problema que é global e que afecta meios aquáticos naturais por todo o planeta (Santos *et al.*, 2005).

Os desenvolvimentos explosivos de fitoplancton estão fortemente associados a massas de água ricas em nutrientes e matéria orgânica, pelo que são vistos muitas vezes como indicadores de poluição orgânica, resultado directo ou indirecto das actividades humanas e suas utilizações do solo. A primeira ideia que surge quando se fala de contaminação de mananciais ou aquíferos é a de que a actividade agrícola é a responsável, o que está, no entanto, longe de ser a único problema. Se por um lado as escorrências agrícolas transportam os suplementos nutritivos adicionados ao solo, por outro a impermeabilização das zonas urbanas potencia também escorrências difusas para os sistemas naturais. É, no entanto, nas descargas de efluentes domésticos e industriais que as contaminações podem atingir maior importância, principalmente devido à sua carga orgânica.

Apesar de conhecida a capacidade de autodepuração dos meios hídricos naturais, é fácil prever que o processo de despoluição acabe dificultado caso as descargas poluentes sejam elevadas e restritas a pequenos períodos de tempo. É neste processo que, em particular nos sistemas lênticos, a eutrofização surge através do enriquecimento excessivo das massas de água em nutrientes e matéria orgânica.

A flora aquática, em especial as algas, utiliza os nutrientes de forma a produzirem biomassa, possibilitando assim o seu desenvolvimento e aumento das comunidades fitoplanctónicas. Se os nutrientes são normalmente assimilados a partir da massa de água, o carbono por sua vez é sintetizado através dos processos fotossintéticos. Se, além dos nutrientes, as condições de temperatura e luminosidade forem favoráveis, o desenvolvimento do fitoplancton, algas e cianobactérias ocorre com facilidade (Santos *et al.*, 2005).

Caso o desenvolvimento dos organismos fitoplanctónicos seja muito rápido e intenso denomina-se por florescência ou *bloom*. Estas situações são mais evidentes para um número reduzido de organismos que podem acumular-se à superfície, entre os quais algumas cianobactérias formadoras de espumas superficiais. Além dos impactos estéticos que este excesso de biomassa em suspensão confere às águas naturais, podem existir problemas de ordem ecológica e sanitária. Os *blooms* de cianobactérias caracterizam-se por conferir às águas gostos e cheiros desagradáveis, uma cor verde-amarelada ou azulada

frequentemente acompanhada da formação de espumas. Estas situações degradam, do ponto de vista estético, a apetência dos locais afectados para actividades de recreio e turismo.

No que toca à ecologia, o aumento de biomassa no sistema hídrico leva, aquando da degeneração da cultura, a um aumento da matéria orgânica em suspensão o que conduz, por si só, a uma situação de poluição orgânica. Além do consumo de oxigénio na degradação desta matéria orgânica presente, o aumento da turvação das massas de água influencia negativamente a produção de oxigénio através da fotossíntese. As duas ocorrências conduzem a uma rápida depleção do oxigénio dissolvido, o que acarreta problemas para a fauna existente no local, podendo levar à sua dispersão ou eliminação de animais como aves e peixes. Assim sendo, esta situação pode ser vista como um problema para a biodiversidade existente no local.

Em meios eutrofizados de climas temperados, as cianobactérias normalmente dominam a população fitoplanctónica durante o Verão e início do Outono (Chorus e Bartram, 1999). Esta dominância pode ser explicada pela capacidade que estes organismos têm de se adaptar a temperaturas elevadas, de capturar luz em comprimentos de onda não utilizáveis pelas algas verdes e pela possibilidade de se desenvolverem em condições com uma razão de N:P e concentração de carbono orgânico dissolvido baixas. Além destas características, algumas espécies de cianobactérias possuem ainda a capacidade de regular a flutuação, de fuga aos predadores e de acumulação fósforo em células especializadas (Whitton e Potts, 2000).

A degradação das massas de água acarreta problemas sanitários seja no uso para recreio seja na produção de água para consumo humano, porque obriga a que esta seja sujeita a tratamentos adequados. No entanto, nem sempre os custos para a saúde são directos. No que toca à ingestão, por exemplo, os problemas são normalmente crónicos e surgem após consumos durante um elevado período de tempo.

Alterações significativas na qualidade da água captada para produção de água potável, implicam modificações na linha de tratamento, de forma a impedir a introdução de água imprópria na rede de distribuição. As microalgas e as cianobactérias, além das características organolépticas que conferem à água, podem provocar obstruções nos filtros das ETA e afectar a eficácia de determinados processos de tratamento.

Caso exista uma elevada concentração de células cianobacterianas produtoras de toxinas em águas utilizadas para recreio, podem ocorrer situações de alergia e irritações cutâneas e das mucosas. Se, normalmente, a ingestão acidental de pequenas quantidades de água contaminada ou espumas, por parte dos humanos, não implica risco de vida, no caso de animais domésticos ou selvagens, a ingestão indiscriminada pode conduzir à morte.

A ocorrência de situações de intoxicação em meios naturais, onde espécies de cianobactérias estão presentes em grande número, leva a que se procure conhecer mais sobre estes organismos. Principalmente ao nível do seu desenvolvimento, substâncias produzidas e suas formas de acção. Perceber as condições ambientais e físico-químicas que resultam na degradação dos sistemas hídricos e afectam os seus usos mais nobres, possibilitam uma aposta concreta na viável resolução dos problemas ambientais e de saúde que destes decorrem.

Na ilha de S. Miguel (Açores) o processo de eutrofização das lagoas é potenciado essencialmente pela intensa actividade agro-pecuária nas suas bacias hidrográficas. Em zonas não urbanizadas, os nutrientes provêm essencialmente da erosão e de escoamentos superficiais e sub-superficiais de terrenos agrícolas (Santos *et al.*, 2005).

A ocorrência, durante todo o ano, de *blooms* algais na Lagoa das Furnas e a necessidade de implementação de medidas de gestão dos sistemas aquáticos e suas bacias hidrográficas, justifica a avaliação das características que favorecem o desenvolvimento de microalgas. Este trabalho surge com o intuito de compreender o comportamento destes organismos. Para avaliar os efeitos das concentrações de azoto e fósforo no meio, realizaram-se ensaios laboratoriais com fitoplankton recolhido em florescências naturais, na Lagoa das Furnas – ilha de S. Miguel (Açores).

O arquipélago dos Açores caracteriza-se pelo clima marítimo com temperaturas que variam entre os 16°C no Inverno e 26°C no Verão. A precipitação é uma constante ao longo de todo o ano, sendo no entanto mais forte e frequente no período de Inverno. As ilhas estão sujeitas a frequentes tempestades e o ar é bastante húmido sendo a humidade relativa média de cerca de 75% (AzoresWeb).

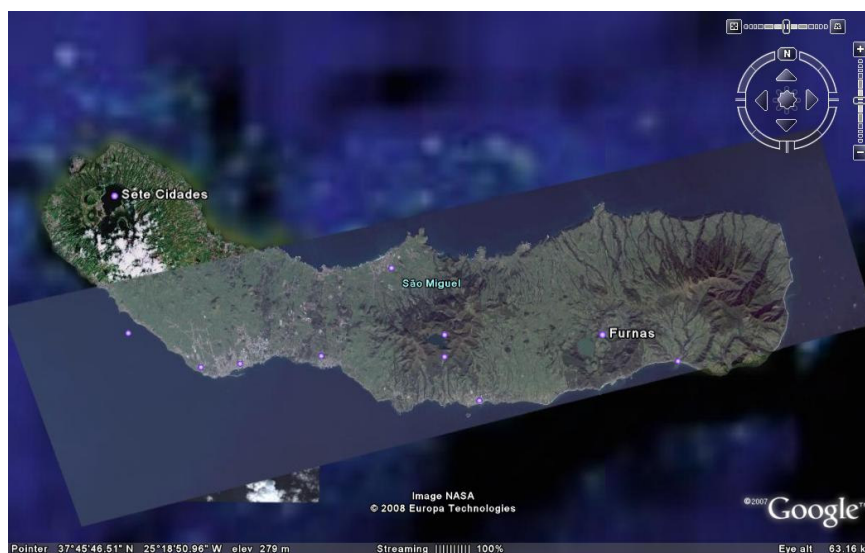


Figura 1 – Imagem de satélite da ilha de S. Miguel, Açores

Fonte: GoogleEarth

S. Miguel (Figura 1), com 757 km², é a maior ilha do arquipélago dos Açores e apresenta uma geologia determinada pelos vulcões de Sete Cidades, Fogo e Furnas (Amaral e Rodrigues, 2007).

A Lagoa das Furnas (37°45'30"N, 25°20'03"W), situada a norte da freguesia de Furnas, é um reservatório natural com um volume aproximado de 9,21*10⁶m³ (Cruz *et al.*, 2006), alojado na cratera de um vulcão. As características desta massa de água são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Caracterização da Lagoa das Furnas

Fonte: Pacheco *et al.*, 2002

	Área	Perímetro	Declive médio	Altitude média	Profundidade		Forma
					(m)		
	(ha)	(km)	(°)	(m)	Max.	Méd.	
Bacia Hidrográfica	1245	10,53	20	280	-	-	Alongada
Lagoa	193	6,3	-	-	15	6,9	Elíptica

Estas características facilitam a ocorrência de condições de estratificação térmica em períodos de Verão.

Segundo Amaral e Rodrigues (2007), as Furnas apresentam um elevado índice de precipitação estimado em 2252mm/ano, um nível de humidade médio de 87% e uma temperatura média da ordem dos 15°C. Estas informações são importantes na medida em que Cruz *et al.* (2006) mostraram que, de uma maneira geral, quanto mais elevada a temperatura da massa de água maior o valor de pH registado, e que a temperatura diminui com o aumento da profundidade. Este padrão é verificado tanto a norte como a sul na lagoa, ainda que a norte as temperaturas sejam ligeiramente mais baixas.

No que toca a carga de nutrientes afluente à Lagoa, está estimado que 29,8 toneladas de azoto e 1,44 toneladas de fósforo são transportados anualmente pelas principais linhas de água e descarregados por estas na Lagoa das Furnas, correspondendo a cerca de 15,5g N/m².ano e 0,75g P/m².ano (Santos *et al.*, 2005).

Lagoas com profundidades semelhantes devem admitir receber cargas máximas de 1,5g/m².ano e 0,10g/m².ano de azoto e fósforo, respectivamente. Cargas da ordem dos 3,0g N/m² ano e 0,20g P/m² ano são já potencialmente responsáveis por estados eutrofizados, daí que Santos *et al.* (2005) definam as cargas afluentes como a principal explicação para que a Lagoa das Furnas apresente um estado de eutrofização tão

avanzado. De facto, em média, o azoto que chega a lagoa é dez vezes superior à carga máxima aceitável e cinco vezes superior à carga de perigo, enquanto o fósforo aflui sete vezes e meia mais que a carga máxima permissível adequada e quatro vezes mais que a definida como carga de perigo.

Tendo em conta as características das massas de água em situações de risco, este trabalho pretende avaliar o efeito sobre o crescimento de uma população fitoplanctónica mista, dominada por cianobactérias, da adição de nutrientes em diferentes concentrações.

O objectivo principal é verificar o comportamento das populações expostas a diferentes teores e formas de nutrientes, quando mantidas nas mesmas condições ambientais. Avaliar se a tendência é, como afirma a generalidade da literatura e o senso comum, para que o crescimento dos organismos ocorra preferencialmente em meios em que os nutrientes estão presentes em concentrações elevadas.

De um modo geral, para que se atingisse a concretização dos objectivos propostos, o trabalho foi estruturado da seguinte forma:

- Primeira fase - recolha de informação e revisão bibliográfica sobre eutrofização e desenvolvimento de cianobactérias;

- Segunda fase - realização de ensaios laboratoriais com recurso a amostras de organismos fitoplanctónicos recolhidas no sistema natural da Lagoa das Furnas, na ilha de S. Miguel – Açores;

- Terceira fase - análise de dados e discussão dos resultados.

A metodologia do trabalho laboratorial, assentou na cultura dos organismos fitoplanctónicos em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa. Durante os ensaios promoveu-se uma avaliação contínua do desenvolvimento da biomassa e do pH. No final do ensaio foram ainda determinadas as concentrações de pigmentos e de nutrientes (N e P) remanescentes em solução.

Só um conhecimento aprofundado sobre o problema do enriquecimento em nutrientes dos sistemas aquáticos e o seu impacto no desenvolvimento de espécies fitoplanctónicas, com especial relevo para as cianobactérias, permite a definição e criação de metodologias com vista a protecção dos ambientes hídricos. Mais que o mero remediar dos problemas, estas linhas de acção devem promover a protecção de zonas passíveis de sofrer de eutrofização. Só as actividades preventivas minimizam os riscos de ocorrência de surtos de fitoplancton e conseqüentemente as situações de toxicidade das massas de água associadas.

Importa ainda ter em consideração que de uma forma geral as acções preventivas implicam um esforço financeiro elevado. No entanto, os casos de restabelecimento de sistemas

naturais, além de dispendiosos em termos económicos, apresentam normalmente custos sociais e ambientais, que nem sempre podem ser determinados.

Neste trabalho apresenta-se uma recolha de informações necessárias ao conhecimento dos vectores mais relevantes associados a situações de risco. E, se nos nossos dias os aumentos de temperatura verificados ao longo dos anos são apontados, por Fernald *et al.*, (2007), como uma causa para o desenvolvimento excessivo de biomassa cianobacteriana nos sistemas hídricos, pode-se verificar que muitos autores antes destes apontaram diversos factores com influência no acelerar do processo de eutrofização e consequente desenvolvimento excessivo de fitoplancton.

2. Eutrofização e florescências de cianobactérias

2.1. Eutrofização

A eutrofização é, segundo o UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas (2001), um dos maiores problemas ambientais das águas interiores, e que consiste no enriquecimento destas em nutrientes, de modo especial em azoto e fósforo.

Segundo Schindler (2006), Hutchinson (1973) afirmou que o termo *eutrofização* surgiu com Weber (1907) e associado ao aparecimento de zonas de pântanos, chamadas *wetlands*. A princípio a utilização do termo era amplamente descritiva, baseada apenas no aparecimento de determinadas espécies de macroinvertebrados bentônicos e de lagos com baixos teores de oxigénio, principalmente nas camadas inferiores, (Figura 2).

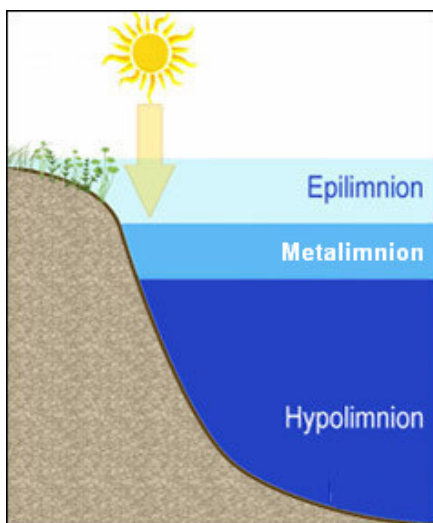


Figura 2 - Esquema do perfil vertical de estratificação de um lago

Fonte: RMB – Environmental Laboratories, Inc. (adaptado)

Só a partir de meados de 1970, a eutrofização começou a ter em conta diversos aspectos físico-químicos que possibilitavam uma caracterização das massas de água de forma mais efectiva. Parâmetros como o conceito de renovação de água, a determinação da produtividade fitoplanctónica em lagoas e o papel importante do que acontece ao nível das bacias hidrográficas, permitiram a integração da informação disponível num sistema terra-água, conferindo assim ao conceito de estado trófico, uma vertente mais dinâmica.

Vollenweider (1968) colaborou nos anos sessenta com a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico (OCDE) na análise do problema da eutrofização. Através de

uma ampla revisão da literatura, conseguiu inferir que o controlo dos *inputs* de fósforo e em alguns casos de azoto em lagoas seria o passo determinante na redução do processo de eutrofização. O seu estudo não foi disseminado enquanto literatura primária¹, mas tornou-se ainda assim a base dos mecanismos de gestão de lagos eutrofizados em todo o mundo e principalmente na Europa (Schindler, 2006 citando Vollenweider, 1968).

O simpósio de Madison sobre eutrofização (EUA - Academia Nacional de Ciência, 1969) também se referiu ao fósforo e o azoto, mas de uma forma passageira (Schindler, 2006). É curiosa a evolução da informação, já que nos dias que correm são estes os nutrientes tidos como determinantes e por isso considerados alvo para o controlo da eutrofização de águas interiores e estuários. Actualmente, a relação entre a carga de nutrientes afluente à massa de água e a possibilidade de eutrofização é mais clara, facto que se deve essencialmente aos avanços das últimas quatro décadas.

Apesar do aumento da evidência entre o fluxo de nutrientes e a eutrofização, nos primeiros anos de IBP - Programa Biológico Internacional, os nutrientes não eram considerados determinantes para a produtividade. Os factores apontados com principais responsáveis eram a luz, a temperatura e a latitude (Kajak e Hillbricht-Ilkowska, 1972 e Brylinsky e Mann, 1973).

A latitude define a altitude a que se encontra o sol e determina a forma de incidência da radiação, o fotoperíodo e a temperatura do ar e da água (Brylinsky e Mann, 1973), pelo que não é uma surpresa quando se refere que afecta em cerca de 56% a produtividade da massa de água. No mesmo estudo é referido ainda que sistemas aquáticos inseridos numa gama estreita de latitudes e por isso sujeitos a idênticos estados de energia, apresentam uma produtividade por unidade de área muito semelhante, independentemente da morfometria do lago.

Segundo Oliver e Ganf (2000), a correlação entre o desenvolvimento de cianobactérias e as estações quentes é duvidosa, já que a temperatura parece influenciar sim, mas através da estratificação das massas de água e alterações na turbulência das mesmas.

A Figura 3 mostra que o processo de envelhecimento e degradação de lagos, albufeiras e reservatórios ocorre de forma natural, o que sustenta a teoria de Brylinsky e Mann (1973). É no entanto, em resultado de acção do homem, que se intensificaram os fenómenos de enriquecimento em elementos nutritivos de onde se destacam o fósforo e o azoto.

¹ Quando a informação científica é exposta pela primeira vez.

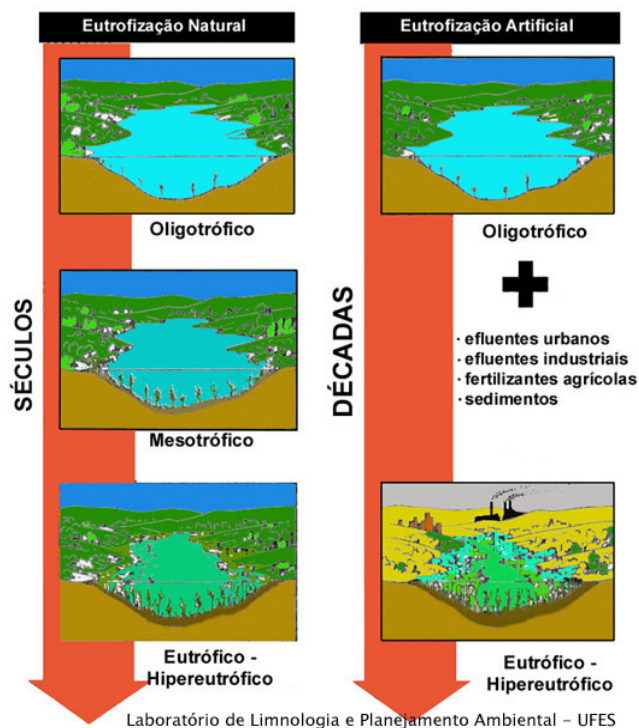


Figura 3 - Diferenças entre a eutrofização de carácter natural e artificial (ou social)

Fonte: UFES-DERN (2001)

Citando Drever (1982) e Domenico e Schwartz (1990), Boavida (2001) assumiu que a maioria dos desequilíbrios do planeta são causados pela actividade humana. Estes influenciam a estabilidade do ciclo hidrológico com consequências para a qualidade das águas naturais, sendo estas situações tão mais graves quanto maior a poluição provocada e a população afectada.

Estudos realizados pela OCDE revelaram que diversos lagos em zonas temperadas viram a qualidade da sua água sofrer uma deterioração acentuada em consequência da actividade humana, sendo este processo designado por “eutrofização cultural”. Esta degradação interfere com os usos mais nobres das massas de água, nomeadamente a produção de água para consumo humano, provocando perdas económicas significativas. Por outro lado, a opinião pública tem-se ainda mostrado sensível ao impacte da eutrofização sobre o turismo e os usos recreativos da água (Santos *et al.*, 2005 citando Vollenweider e Kerekees, 1982 em Mandaville, 2000).

As alterações da natureza e das actividades humanas contribuem para a degradação tanto da qualidade de águas subterrâneas como superficiais, no entanto é nestas últimas que o problema da eutrofização se torna mais visível (Santos *et al.*, 2005). De entre mares, rios, lagos e reservatórios podem destacar-se como mais problemáticos os sistemas em que o tempo de residência da massa de água é mais longo, pois tendem a acumular sedimentos que actuam normalmente como depósitos de nutrientes. A permanente introdução de

nutrientes pode provocar perturbações no meio natural pelo excessivo crescimento de produtores primários e conseqüentemente acréscimo de biomassa disponível. Ainda que o estudo de Painting *et al.* (2007) diga respeito a sistemas estuarinos, pode-se admitir que as conseqüências referidas são válidas também para águas interiores, na medida em que o crescimento excessivo de fitoplancton potencia o aumento da turvação da massa de água. Esta restringe a penetração da luz na coluna de água o que põe em causa a distribuição das algas em profundidade. As mudanças de condições são citadas como tendo implicações importantes na estrutura e funcionamento dos ecossistemas ao nível das teias alimentares.

O azoto e o fósforo são considerados nutrientes causadores de poluição. Se por um lado o fósforo surge naturalmente em resultado da erosão de rochas com fosfatos e o azoto chega normalmente às águas naturais por dissolução directa na massa de água, por outro sabe-se que cada vez mais estes nutrientes chegam aos sistemas naturais através de escoamentos superficiais ou subterrâneos de actividades agrícolas agro-pecuárias e descargas de águas residuais (Boavida, 2001).

No final dos anos sessenta a gestão da eutrofização começou a centrar-se no nutriente fósforo, sendo este normalmente considerado como limitante ao crescimento fitoplanctónico na maioria dos lagos. No entanto, Schindler (1978) afirmou que sendo o fósforo um dos mais populares índices de eutrofização, seria de esperar uma boa relação entre a produtividade primária e as entradas de fósforo no sistema, o que de facto não se observa, pois a correlação de 0,23 obtida para estes parâmetros é pouco significativa.

Vollenweider (1968) propôs como medidas para a redução dos teores de fósforo em sistemas naturais a alteração da composição dos detergentes, que na altura continham cerca de 50% de fosfatos, e a remoção do fósforo das águas residuais (Schindler, 2006).

Carlson (1977), desenvolveu um índice que permite ainda hoje a avaliação do estado trófico (Quadro 2) de um sistema aquático – TSI (Harper, 1992). Este índice baseia-se nos valores de transparência da massa de água (T), de clorofila-a (Cl_a) e de fósforo total (PT). Este último é considerado como directamente relacionado com a biomassa considerando que o fósforo total é o factor limitante ao crescimento das algas. São estes três parâmetros que, de forma independente, permitem aferir o estado trófico de uma massa de água.

A nível nacional (CCDR/LVT, 2006) utiliza-se uma escala discreta de categorias para definir o estado trófico.

Quadro 2 – Relação entre o TSI e o estado trófico

Fonte: CCDR/LVT, 2006

	PT ($\mu\text{g/L}$)	TSI (PT)	Cla ($\mu\text{g/L}$)	TSI (Cla)
Oligotrófico	< 10	< 37	< 2,5	< 40
Mesotrófico	10 – 35	37 – 55	2,5 - 10	40 – 53
Eutrófico	> 35	> 55	> 10	> 53

Segundo Schindler (1978), o IBP reconheceu mais tarde a importância dos nutrientes e da mistura da coluna de água, pelo que o alvo dos estudos foi sendo alterado ao longo do tempo. Mesmo assim, o autor afirma que durante muito tempo foram esquecidos os efeitos do impacto nos sistemas aquáticos, ao nível das comunidades.

Citando Kjerfve (1994) e Castel *et al.* (1996), Kozlowsky-suzuki *et al.* (2002) mostraram que elevados teores de nutrientes afluentes às lagoas, associados a uma intensa radiação solar e a uma frequente mistura da coluna de água, favorecem elevadas taxas de produtividade. O autor verificou ainda que este enriquecimento potencia consequentemente um aumento do número de cianobactérias e de clorofila-*a*.

Experiências no Lake McIlwaine sugeriam que a redução da carga de nutrientes provocava a diminuição da biomassa fitoplanctónica e concluíam ainda, mas de forma irrealista, que as comunidades de cianobactérias desapareceriam por acréscimo (Oliver e Ganf, 2000).

Os modelos desenvolvidos nos anos 70 (Dillon e Rigler, 1974 e Vollenweider, 1976) são ainda hoje utilizados como base das metodologias de gestão de lagoas e mostram que a taxa de renovação da massa da água é importante para a carga de nutrientes disponível. Nos lagos onde a ressuspensão do fósforo a partir dos sedimentos é baixa, a duplicação do tempo de renovação da água tem um efeito semelhante à duplicação da carga de nutrientes que a ele aflui, sendo assim um importante factor com efeitos sobre a eutrofização (Schindler *et al.*, 1978).

Referindo como exemplo o Lago Tahoe, Goldman (1981) considerou evidente que lagos em situação de limitação de azoto, rapidamente passavam a ser limitados pelo fósforo. Esta alteração dever-se-ia essencialmente à entrada de azoto no sistema por acção antropogénica (Schindler, 2006). Estes lagos com limitadas concentrações de azoto eram, em meados do século XX, deixados de fora dos esforços para o combate à eutrofização. No entanto, o rápido aumento de deposição atmosférica de N e do uso de fertilizantes azotados

nos solos das bacias hidrográficas, fizeram com que acabassem reconhecidos como parte integrante do problema (Schindler, 2006 citando Vitousek e Howarth, 1991, Tilman *et al.*, 2001 e Sickman *et al.*, 2003).

Oliver e Ganf (2000) referem bioensaios em que a adição simultânea de N e P induziu o crescimento cerca de 86% das vezes, enquanto a adição de apenas N ou P produziu resultados positivos apenas 40% e 47% das vezes, respectivamente. Estes valores mostram que nenhum dos dois nutrientes deve ser descurado no que respeita ao controlo do processo de eutrofização.

O artigo de Schindler (2006) destacou o facto de Wetzel (2001) ter apontado o uso da produção de biomassa como a variável chave na classificação dos reservatórios, eliminando assim algumas das dificuldades na atribuição de uma classificação através de metodologias anteriores. De facto, alguns estudos, como o de Gowen *et al.* (1992), apresentam relações empíricas entre nutrientes, em particular concentrações de azoto e clorofila-*a*, sendo esta representativa do fitoplankton existente no meio.

Segundo Santos *et al.* (2005), o intenso processo de produção biológica é responsabilidade do aumento do nível de nutrientes, em especial azoto e fósforo. No entanto, Boavida (2001) referiu que o desenvolvimento exagerado de produtores só ocorre quando se combina uma grande quantidade de nutrientes disponíveis com uma população de predadores insuficiente para equilibrar o sistema, já que a predação é normalmente um factor de redução da biomassa e/ou de alteração da composição das comunidades de fitoplankton (Oliver e Ganf, 2000).

Fulton e Pearl, 1987, Lampert, 1987 e DeMott, 1999 apontaram a presença de filamentos ou a formação de colónias, deficiências nos nutrientes essenciais e portanto com baixo valor nutricional e produção de compostos intracelulares tóxicos, como características que fazem das cianobactérias um alimento de baixa qualidade (Nogueira *et al.*, 2006). Este facto pode estar relacionado com a diminuição do efeito estabilizador dos predadores no tamanho da população.

Dos factores apontados como responsáveis pela excessiva produtividade nos sistemas aquáticos, Schindler (1978) afirmou que apenas a quantidade de nutrientes que afluem aos lagos pode ser controlada pelo Homem. Mais tarde, Oliver e Ganf (2000) admitiram que a promoção da mistura da coluna de água funciona mais rápida e eficientemente que a gestão de populações de cianobactérias por biomanipulação ou redução de nutrientes afluentes ao sistema.

Na maior parte dos reservatórios e lagos o crescimento das plantas e algas à superfície ocorre preferencialmente em períodos de temperatura e radiação mais elevadas, como

durante a Primavera e o Verão. Já por alturas do Outono estas populações tendem a decair e acabam por se afundar na massa de água, sofrendo posterior decomposição.

Durante os períodos em que as massas de água estão saturadas de oxigénio, à custa das elevadas densidades de seres fotossintéticos, o O₂ excedente é libertado para a atmosfera. Na fase seguinte, da degradação da matéria orgânica por parte da comunidade microbiana, os reduzidos teores de oxigénio nas camadas inferiores dos lagos podem conduzir a condições de anóxia. A degradação da matéria orgânica ao potenciar a diminuição das disponibilidades de oxigénio dissolvido na massa de água, apresenta consequências para as espécies aquáticas mais sensíveis, podendo, em condições extremas, conduzir ao seu desaparecimento (Faria, 1993 em Kozlowsky-suzuki *et al.*, 2002).

Segundo Schubert *et al.* (2003), são as descargas de águas residuais domésticas e/ou industriais nos centros urbanos e as escorrências provenientes das actividades agrícolas nas regiões rurais as principais fontes de matéria orgânica e nutrientes para os sistemas hídricos. Estas descargas provocam localmente uma imediata redução da concentração de oxigénio dissolvido, pelo que se admite uma estreita relação entre o oxigénio consumido e a quantidade de matéria orgânica degradada. É nesta perspectiva que este parâmetro de avaliação da qualidade da água ganha importância, pois reflecte o consumo de oxigénio por parte dos organismos decompositores de matéria orgânica.

As cianobactérias podem representar grande parte do fitoplâncton das comunidades dos sistemas de tratamento de águas residuais por lagunagem, principalmente devido à temperatura elevada, à concentração de nutrientes e à estabilidade das águas nas lagoas. Aquando das descargas, estes organismos podem ser considerados como agentes contaminantes das massas de água naturais (Vasconcelos e Pereira, 2001).

A UNEP (2001) refere que o enriquecimento das massas de água favorece o crescimento, através do processo de fotossíntese. Neste processo, são gerados compostos orgânicos e biomassa pela fixação de nutrientes disponíveis tanto no solo como na água. A fotossíntese faz uso da luz solar, como fonte de energia, e do CO₂ disponível na massa de água como fonte de carbono.

As variações de pH são maiores em águas com fraco poder tampão e dependem, entre outros factores, da actividade fotossintética e da temperatura. Estes processos tendem a deslocar o equilíbrio químico do sistema no sentido da diminuição da concentração de ácido carbónico em solução (Duarte, 2000). Se por um lado, o CO₂ dissolvido é assimilado no processo fotossintético, por outro, as temperaturas elevadas aumentam a reactividade do ácido carbónico facilitando a libertação do dióxido de carbono para a atmosfera. Em ambas as situações a diminuição da concentração de CO₂ dissolvido conduz a um aumento do pH da água (Schumacher e Sekoulov, 2002).

As cianobactérias são organismos que normalmente dominam o fitoplâncton em sistemas aquáticos cujo pH é elevado. King (1970) afirmou que este facto pode conduzir à hipótese de que estes organismos competem de forma vantajosa com microalgas eucarióticas em situações em que o CO₂ disponível é reduzido. Por seu lado, Shapiro (1997) concluiu que não é o pH elevado e as baixas concentrações de CO₂ que potenciam o desenvolvimento de cianobactérias mas que a sua abundância promove uma redução do dióxido de carbono a níveis só utilizáveis por elas. A proporção de CO₂ é máxima para pH 4, mas reduz-se para cerca de 0,003% a pH 9 (Oliver e Ganf, 2000).

Segundo o estudo da CCDR/LVT (2006), o transporte de nutrientes para as massas de água ocorre através de uma série de processos físico-químicos e biológicos que se definem como ciclo de nutrientes. Os dois ciclos principais são o do azoto e o do fósforo.

O ciclo do Azoto:

O azoto é um macronutriente necessário ao desenvolvimento dos organismos fitoplanctónicos. Este nutriente é parte integrante de ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e clorofila.

A atmosfera é na sua maioria composta por azoto molecular (N₂), mas para que este seja consumido pelos organismos tem de sofrer um processo de conversão à forma amoniacal (NH₄) ou de nitrato (NO₃). Em primeiro lugar, organismos como algumas algas azuis-verdes (cianobactérias) e as bactérias dos géneros *Rhizobium* e *Azotobacter* fixam azoto atmosférico. Dividem depois a molécula permitindo que o azoto se combine com o hidrogénio formando azoto amoniacal (NH₄). Por outro lado, organismos que decompõem os tecidos e a matéria morta em aminoácidos possibilitam a oxidação posterior destes em água e CO₂ e libertam o azoto amoniacal.

O azoto inorgânico na forma amoniacal é assimilável pelas algas, no entanto acima de determinados níveis esta forma ionizada tende a converter-se em amoníaco (NH₃) apresentando-se tóxico para algumas espécies. Por outro lado, em termos ambientais, Boavida (2001) refere ainda que o azoto amoniacal pode ser oxidado a nitrato por bactérias nitrificantes, com elevado consumo de oxigénio que potencia o processo de desoxigenação da água.

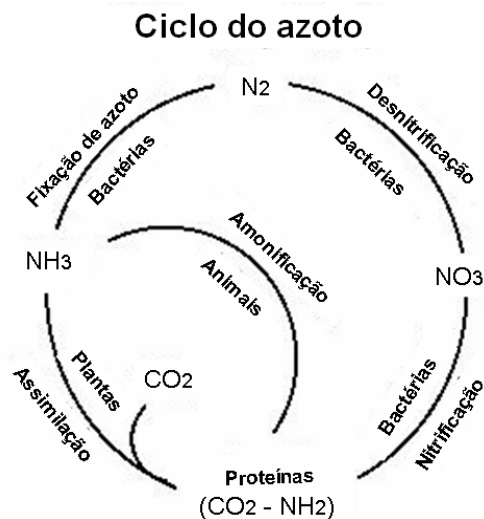


Figura 4 - Ciclo do azoto

Fonte: Hartzog, K.C. (adaptado)

As formas azotadas mais perigosas para o Homem são as inorgânicas (Boavida, 2001 citando Mceldowney *et al.*, 1993), em particular o ião amónio que, em climas em que a temperatura da água exceda os 20°C, pode ser convertido em amónia não ionizada ou amoníaco NH_3 , que é tóxico. Esta toxicidade aumenta com o aumento do pH.

A existência de amónia traduz uma degradação incompleta de matéria orgânica (Duarte, 2000 citando Rodier, 1984), pelo que está associado a ambientes naturais em que o processo de decomposição de compostos orgânicos ocorre em condições de oxigénio dissolvido insuficiente. Imediatamente a jusante de focos de poluição podem encontrar-se concentrações de azoto amoniacal de 0,5 a 3mg/L (Dias, 2000 citando Formigo, 1997).

No processo de nitrificação, o azoto amoniacal é oxidado por bactérias como *Nitrosomonas* a nitritos e estes são oxidados por bactérias como *Nitrobacter* a nitratos. A desnitrificação consiste numa redução dos nitratos a azoto molecular gasoso por acção de organismos anaeróbios (CCDR/LVT, 2006).

Os nitratos são a forma mais oxidada obtida na mineralização dos compostos azotados. Não são compostos tóxicos, ainda que a sua conversão em nitritos lhes confira uma toxicidade indirecta (Duarte, 2000 citando Rodier, 1984). Quando em excesso, estão associados a fenómenos de eutrofização e segundo Dias (2000) citando Nisbet e Verneaux (1970), à medida que o grau de trofia das águas naturais aumenta, consequência da introdução de matérias orgânicas, os teores de nitratos podem atingir valores de 1 a 2mg/L.

O ciclo do Fósforo:

O fósforo é normalmente o macronutriente mais escasso na natureza, pelo que é normalmente limitador ao desenvolvimento das comunidades de microalgas. Em águas superficiais com pH compreendido entre 5 e 8, o fósforo encontra-se naturalmente sob a forma de ortofosfatos (Dias, 2000 citando Rodier, 1984).

As formas fosfatadas disponíveis para as plantas e algas são as inorgânicas de ortofosfato H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} , o chamado fósforo solúvel reactivo. Nos detritos e plâncton o fósforo apresenta-se sob a forma orgânica. A relação entre as formas mais e menos biodegradáveis, depende das condições ambientais e da acção microbiana (CCDR/LVT, 2006). Segundo Dias (2000) em águas superficiais, concentrações de 0,1 a 0,2 mg de H_3PO_4 /L indiciam poluição da massa de água e conseqüentemente potencial grau de eutrofização.

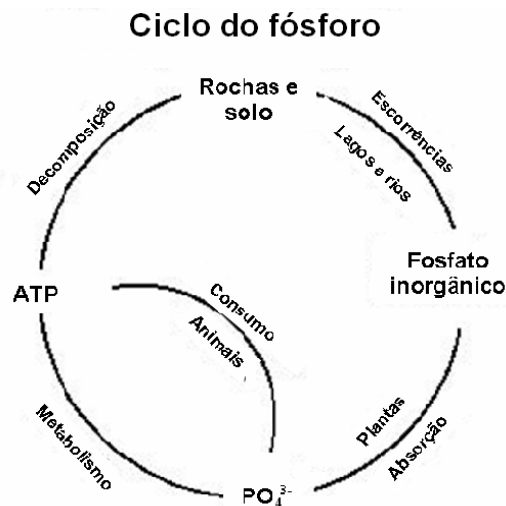


Figura 5 - Ciclo do fósforo

Fonte: Hartzog, K.C. (adaptado)

Quanto à disponibilidade de fósforo, para tempos de residência curtos, como acontece nos rios, a medição das formas reactivas é a mais adequada já que a sua conversão é reduzida; em lagos e albufeiras, a determinação do fósforo total é o meio mais adequado para avaliar o fósforo disponível.

O tema da eutrofização cria polémica a partir do momento em que se inicia a busca dos responsáveis. Temos como exemplo as fortes contestações dos produtores de detergentes, como é referido em Schindler (2006), aquando da responsabilização destes pela introdução excessiva de fósforo nos sistemas hídricos. Ao sentirem-se prejudicados pelas conclusões

apresentadas, apelaram à primazia da eficiência dos seus produtos fosfatados face aos seus hipotéticos efeitos no ambiente. É citado ainda no mesmo artigo que são os ditos produtores que surgem como impulsionadores da divulgação dos estudos de Hutchinson e Bowen (1947, 1950), Kuentzel (1969), Kerr *et al.* (1970) e Lange (1970). Nos primeiros, era referido que nos sistemas hídricos o fósforo era rapidamente reciclado o que impossibilitava a sua redução com vista ao controlo da eutrofização, já nos restantes as experiências realizadas mostraram que o controlo da produtividade era dependente do carbono e não do fósforo disponível. Os ensaios publicados apresentavam porém uma falha comum, a não avaliação preliminar do estado das massas de água estudadas no que toca aos efeitos já provocados pelo fósforo.

A possível influência do carbono na eutrofização, levou o *Freshwater Institute* (West Virgínia, EUA) a definir uma Área Experimental de Lagos (AEL), em que os lagos abrangidos foram definidos como oligotróficos. Estes sistemas lagunares apresentavam reduzidas concentrações de carbono inorgânico dissolvido - CID (Schindler 2006). O objectivo do estudo era verificar, com base nas informações recolhidas, se os lagos podiam ser levados a atingir um grau de eutrofização por adição de azoto e fósforo. Escolheram o lago com menor DIC e no início de 1969 começaram a adicionar N e P numa razão 14:1 em peso tendo rapidamente verificado que apesar dos baixos teores de carbono, o lago se tornou eutrófico (Schindler, 2006 citando Schindler *et al.*, 1971, 1973). O carbono não é naturalmente o nutriente limitante já que, se por um lado as algas consomem o carbono inorgânico dissolvido na massa de água através da fotossíntese, por outro podem substituí-lo por CO₂ atmosférico, o que mostra que a gestão do carbono não é problemática.

T. Edmondson (1970, 1991 referido em Schindler, 2006) dedicou-se à documentação da eutrofização do Lago Washington à medida que a cidade de Seattle crescia. Baseando-se nas correlações entre o fósforo e culturas permanentes de algas, ele deduziu que o fósforo é o possível culpado do processo de degradação. Nestas condições, a cidade decide desviar a descarga de águas residuais do reservatório, levando a que este recuperasse rapidamente.

Face ao desvio das águas residuais drenadas, os produtores de detergentes tentaram influenciar as conclusões publicitando que os estudos de Edmondson eram inválidos, porque além do fósforo outros nutrientes eram afastados do lago (Schindler 2006). Ignorando o sistema causa-efeito, de modo a contrariar os resultados do estudo tentaram ainda impor a ideia de que era a redução de fitoplancton na massa de água que provocava uma redução nos teores de fósforo (Edmondson 1991 citado em Schindler 2006).

Schindler (2006) afirmou que a recolha de informação por parte dos limnologistas possibilitou que o controlo do fósforo fosse encarado como uma das medidas mais comuns na maioria dos países desenvolvidos. Citam-se, como mais relevantes, Edmondson (1970),

Ahlgren (1978), Holtan (1981) e ainda a resolução lida no IXX Congresso Internacional da Sociedade Limnológica - SIL: “Pelo papel crítico do fósforo no rápido desenrolar do processo de eutrofização, fica definido que além do tratamento secundário de águas residuais é necessário o controlo das descargas deste elemento nas águas interiores.”

Schindler (1978) sugeriu que deveriam ser postas em prática o mais rapidamente possível estratégias de gestão de corpos de água. Mais de uma década depois da UWWTD – *Urban Wastewater Treatment Directive* C.E.C. (1991,2000) definir a eutrofização como um “indesejável distúrbio da qualidade da água” (Painting *et al.*, 2007), continuam a ser feitos esforços na tentativa de implementar ferramentas de determinação de riscos e impactos da eutrofização. Daí que no mesmo estudo de Painting *et al.* (2007), se afirma que grandes avanços foram conseguidos relativamente à eutrofização através da mais variada pesquisa desenvolvida nos últimos 30 anos, mas ainda assim muito há a fazer, principalmente no que toca às fontes difusas de nutrientes.

Apesar da importância de manter a qualidade da água, as comunidades humanas efectuem descargas de efluentes domésticos e/ou industriais nos sistemas hídricos, que são potenciais causadores de poluição (Boavida, 2001). Além disso, ensaios de Mortimer (1941, 1942) mostraram a influência da libertação de fósforo e azoto dos sedimentos em lagos com condições de anóxia no fundo. Lagos pouco profundos situados em zonas de solos ricos em fósforo, que sofrem a cada Verão repetidos períodos de anóxia, estão sujeitos a grandes libertações de P dos sedimentos. Este tipo de lagos tende a ser eutrófico ainda que as actividades humanas não contribuam grandemente para as entradas de P no sistema (Schindler e Comita, 1972 e Bática, 1975 em Schindler, 2006) e é por isto que se pode afirmar que em alguns casos o cálculo da carga interna de um sistema, fica além das descargas a que ele aflui.

Com o passar do tempo, os nutrientes acumulam-se naturalmente nas bacias lacustres, promovendo um maior desenvolvimento de fitoplancton, o que conduz ao aparecimento de *blooms* (Boavida, 2001 citando Wetzel, 1993). Desta forma pode-se perceber que não é a eutrofização o problema, já que segundo Boavida (2001) este é um processo natural, lento e gradual, levando dezenas de anos a estabelecer-se. O verdadeiro problema está na taxa acelerada a que este processo ocorre, potenciado pelas actividades antropogénicas.

São os *blooms*, em particular os de cianobactérias, a pior consequência da eutrofização para as populações já que estes organismos produzem uma série de diferentes tipos de toxinas com efeitos nefastos para a saúde, em casos de utilização de água contaminada (Vasconcelos, 1995 em Boavida, 2001 e Azevedo, 1998).

2.2. Florescências de cianobactérias

As cianobactérias, ou algas azuis-verdes são organismos procariontes e fotossintéticos, muito comuns em sistemas aquáticos, em particular em águas doces, paradas e eutróficas. Ainda que estes organismos tenham preferência por águas neutras a alcalinas, em que o pH varia de 6 a 9, com temperaturas entre os 15 e 30°C e elevada concentração de azoto e fósforo (Chorus e Bartram, 1999) podem também ser encontrados em diversos ambientes, sejam eles terrestres - rochas, cascas de árvores, paredes, telhados, vidros, ou aquáticos - rios, estuários e mares (UPC, 2002).

A sua elevada capacidade de adaptação é-lhes apontada como sendo uma garantia de perpetuarem a sua presença na superfície terrestre. Existem referências de que a origem das cianobactérias está estimada em cerca de 3,5 biliões de anos, pelos fósseis descobertos em rochas sedimentares na Austrália (Azevedo, 1998 e Osswald *et al.*, 2007 citando Wilmotte, 1994 e Falconer, 2005).

As cianobactérias são microrganismos versáteis que podem viver em ambientes terrestres e aquáticos. Em águas não poluídas, estes organismos são sazonais, mas em situações de eutrofização, elas tornam-se parte dominante do fitoplancton, por períodos de tempo normalmente superiores, com consequências para a saúde e ambiente (Osswald *et al.*, 2007).

Segundo o MRACC - *Murray Regional Algal Coordinating Committee* (2002), de uma forma geral, as cianobactérias podem ser encontradas em todo o tipo de habitats que forneçam condições de desenvolvimento e reprodução. De acordo com UPC (2002) esta capacidade de adaptação está relacionada com a flexibilidade que as cianobactérias apresentam face a alterações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas.

Braga (2004), afirma que as cianobactérias não são muito exigentes em termos da disponibilidade de nutrientes necessária ao seu desenvolvimento, já que na presença de luz conseguem desenvolver-se em meios minerais. Normalmente, utilizam sais de azoto inorgânico e bicarbonatos, ou o dióxido de carbono atmosférico como fontes de N e C.

Algumas cianobactérias utilizam o azoto (N_2) transformando-o em amónia (NH_3). Esta capacidade associada a baixos teores de luminosidade e nutrientes, e a presença de vesículas gasosas em algumas espécies, que as permitem migrar pela coluna de água, tornam-nas ecologicamente mais favorecidas nos sistemas hídricos. Quando as cianobactérias atingem elevada densidade celular, dominam normalmente face outros tipos de fitoplancton. Estes *blooms* surgem normalmente à superfície da água e nas margens, caracterizam-se por apresentar uma cor azul-esverdeada pela presença de pigmentos fotossintéticos (Dittman e Wiegand, 2006).

Durante muito tempo foram classificadas como algas, aparecendo associadas à divisão *Cyanophyta* ou à classe *Cyanophyceae*, daí que o termo cianofíceas seja ainda hoje utilizado (Azevedo 1998). As cianobactérias eram consideradas algas pelo seu tamanho, mas principalmente pela sua tonalidade maioritariamente esverdeada e pela capacidade de realizar fotossíntese. As suas características de plantas e bactérias, fizeram da sua classificação taxionómica um problema para botânicos e bacteriologistas (Osswald *et al.*, 2007 citando Wilmotte, 1994). A classificação taxionómica foi baseada nas suas características morfológicas, no entanto estas podem alterar-se de acordo com as condições ambientais, pelo que influenciam a classificação de modo duvidoso, daí que Drouet (1968) tenha chamado a atenção para as variabilidades genéticas no mesmo fenótipo (Osswald *et al.*, 2007).

Para além destas características, casos de intoxicação de gado despertaram a atenção para estes organismos, levando a que se efectuassem estudos sobre a sua toxicidade (Bartram, 1998). Actualmente, sabe-se que não têm qualquer tipo de relação filogenética com qualquer grupo de algas, pelo que fazem parte de um filo específico, do domínio *Bacteria*.

Estes organismos possuem uma parede celular constituída por uma fina camada de citoplasma por fora da membrana celular, uma camada rígida de mureína, um peptidoglicano, e duas camadas de polissacarídeos associados a lípidos e proteínas. Algumas espécies possuem ainda uma espessa camada gelatinosa externa que permite a agregação das células em colónias. O espaço periplasmático representado na Figura 6 permite às células o armazenamento de enzimas degradativas (wikipédia).

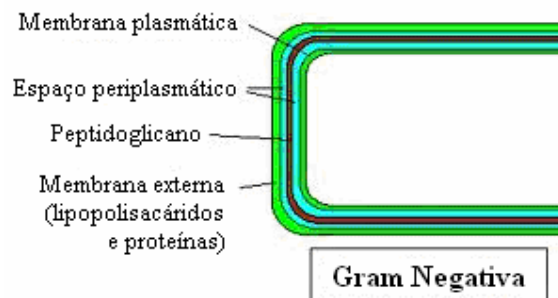


Figura 6 - Esquema da parede celular de uma célula Gram Negativa

Fonte: Wikipédia (adaptado)

Ainda que sejam classificados como gram-negativos, estes organismos podem apresentar uma parede celular que inclui uma série de características combinadas, pelo que Hoiczkyk *et al.*, (2000) refere-se a este tipo de classificação como simplista.

De uma forma geral as cianobactérias apresentam uma camada de peptidoglicano mais grossa que as bactérias *gram*-negativas típicas, atingindo mais de 700nm na *Oscillatoria princeps* (Hoiczky e Baumeister, 1995). O grau de ligação entre as cadeias de peptidoglicano na *Synechocystis* sp. é muito superior aos 20-33% da maioria das *gram*-negativas (Glauner *et al.*, 1988), e há ausência de ácido teicóico nas paredes de células de cianobactérias, constituinte esse que é típico na constituição das células bacterianas (em Hoiczky, *et al.* 2000).

As cianobactérias podem ser unicelulares como os géneros *Synechococcus* e *Aphanothece* ou formar colónias globulares como *Microcystis*, *Gomphospheria*, *Merismopedia*. Podem ainda apresentar-se em colónias sob a forma de filamentos como *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc* (UPC, 2002). Segundo MRACC (2002), as colónias filamentosas podem apresentar três tipos de células diferenciadas: células vegetativas, que são as células fotossintéticas; acinetos, esporos resistentes onde ocorre a acumulação de substâncias de reserva como o amido e que se formam em condições ambientais mais difíceis; heterocistos, células de paredes densas que contêm nitrogenase, um enzima necessário à fixação de azoto, e que também se formam sempre que o azoto combinado esteja abaixo dos 50-100µg/L (Oliver e Ganf, 2000). Importa referir no entanto que espécies de *Oscillatoria* não formam heterocistos mas são capazes de fixar azoto atmosférico (Oliver e Ganf, 2000).

As figuras que se seguem são desenhos esquemáticos das principais espécies nocivas de cianobactérias. A questão principal no que toca a cianobactérias em corpos de água doce é a sua capacidade de produção de toxinas, que se apresentam como riscos para a saúde humana e dos ecossistemas. Este facto levou a que a comunidade científica desenvolvesse pesquisas com vista a compreensão das cianobactérias assim como as circunstâncias potenciadoras de produção de tóxicos (Osswald *et al.*, 2007).

Como se pode ver pela Figura 7, as colónias de cianobactérias podem apresentar-se sob diferentes formas e tamanhos. Estes aglomerados podem sofrer alterações de dimensão por crescimento ou diminuição do número de indivíduos mas também pela agregação de outras colónias (Oliver e Ganf, 2000 citando Reynolds *et al.*, 1981). Este tipo de associação apresenta vantagens do ponto de vista da regulação da capacidade de flutuar, a captura de nutrientes, trocas gasosas e tornam-se menos susceptíveis de sofrer predação (Oliver e Ganf, 2000).

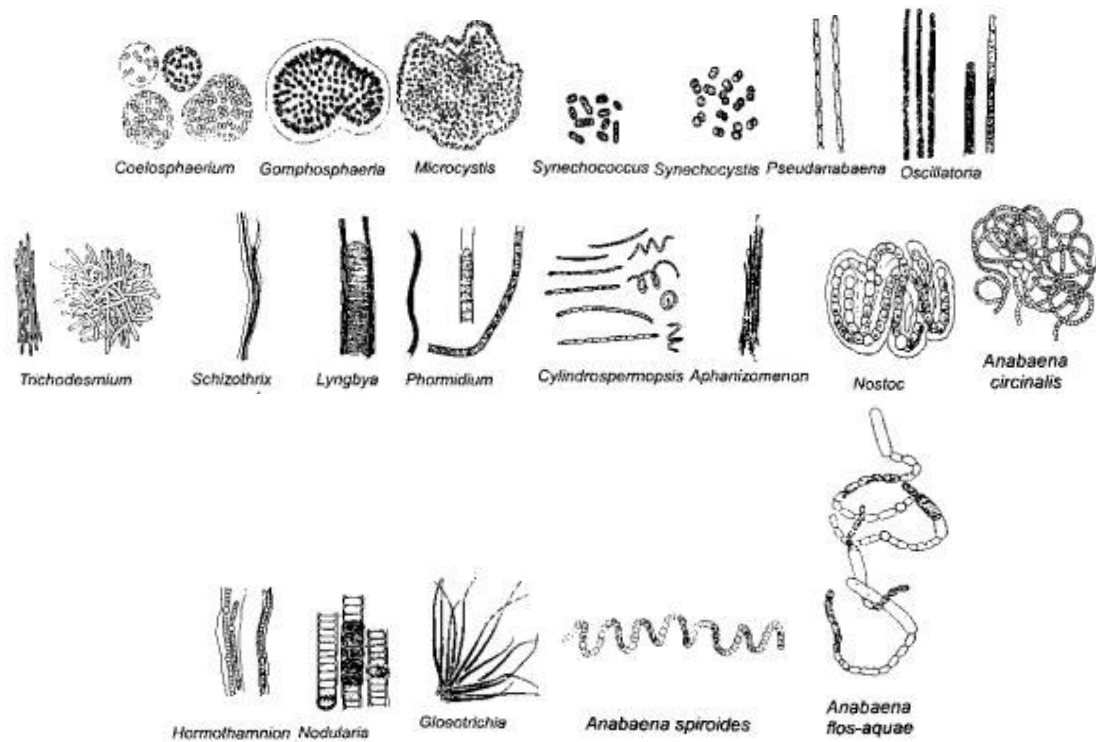


Figura 7 - Esquemas de espécies de cianobactérias

Fonte: UPC (adaptado de Chorus e Bartram, 1999)

Estes organismos não possuem flagelos. O movimento de algumas cianobactérias depende de fibras em espiral que podem existir na parede celular ou de migração vertical na coluna de água. Esta deslocação na coluna de água é possibilitada por vesículas gasosas lateralmente conectadas a tubos de proteínas desprovidos de membranas (Jochem, 2002). A movimentação em profundidade na massa de água permite às cianobactérias procurar as condições mais adequadas para a realização de fotossíntese ou maior disponibilidade de nutrientes (Azevedo, 1998). Na bibliografia os vacúolos são associados à capacidade que estes organismos têm de flutuar, principalmente como resposta na alteração das condições ambientais. Algumas das vantagens são a obtenção de melhores condições de luminosidade assim como o acesso a reservas de nutrientes em particular em massas de água estratificadas (Oliver e Ganf, 2000 citando Reynolds e Walsby, 1975, Ganf e Oliver, 1982, van Rijn e Shilo, 1985, Walsby, 1987, Reynolds *et al.*, 1987, Walsby, 1994, Humphries e Lyne, 1988, Walsby *et al.*, 1997).

Segundo Hoiczky (2000), a permeabilidade das membranas externas das bactérias *gram*-negativas deve-se à existência de purinas, proteínas que formam canais que permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular (citando Benz e Bauer, 1988). Estes canais são menores em células de cianobactérias. Ainda que se desconheça a explicação para

este facto, Hoiczky, (2000) diz que apenas se pode admitir que se deva às características fotoautotróficas das cianobactérias, cujos poros só precisam ser capazes de permitir a assimilação de nutrientes disponíveis no meio e não moléculas grandes, já que essas são sintetizadas pelas próprias cianobactérias.

A maior parte do fitoplankton é capaz de armazenar suplementos de fósforo, normalmente na forma de polifosfato. Sommer (1985) sugeriu que a acumulação de fósforo é maior em cianobactérias que na maioria das microalgas, o que lhes confere vantagens competitivas. Por sua vez, Istvánovics *et al.* (1993) investigaram a captura de fósforo da *G. echinulata*, uma cianobactéria filamentosa não fixadora de azoto, no Lake Erken e mostraram que esta é incapaz de utilizar o fósforo presente no fundo do lago durante o *bloom*. Ao contrário da *Microcystis* esta não parece conseguir regular a sua capacidade de flutuar pelo que os autores concluíram que as colónias armazenam fósforo antes de ascender à superfície, usando as reservas internas no crescimento (Oliver e Ganf, 2000).

O azoto é importante na composição das vesículas gasosas. A sua baixa disponibilidade no meio afecta além do crescimento celular, a sua capacidade de flutuar e regular a sua flutuação. A limitação em azoto pode ser particularmente crítica para espécies formadoras de *blooms* que não sejam fixadoras de azoto (Oliver e Ganf, 2000).

O azoto pode ser adquirido como NO_3^- , NO_2^- ou NH_4^+ e ainda como N_2 . A ordem de preferência é $\text{NH}_4^+ > \text{NO}_3^- > \text{N}_2$ (Tandeau de Marsac e Houmard, 1993) e quando NH_4^+ está disponível as cianobactérias e microalgas não assimilam formas alternativas de N (Oliver e Ganf, 2000 citando Turpin, 1991 e Ochoa de Alda *et al.*, 1996). Células que crescem em meios com condições limitantes de azoto, melhoram substancialmente a sua capacidade de capturar este nutriente. As cianobactérias não fixadoras são favorecidas em meios com azoto combinado, algas eucarióticas em meios com nitratos e as cianobactérias fixadoras em meios com concentrações deficientes de azoto (Oliver e Ganf, 2000).

Enquanto algumas espécies sintetizam matéria orgânica como as bactérias autotróficas, através do sulfureto de hidrogénio (H_2S), a maioria realiza fotossíntese ao nível das pregas da membrana celular, nos tilacóides, e não em fotossistemas I e II organizados em cloroplastos como as plantas (UPC, 2002).

O facto de serem seres fotossintéticos e de serem os organismos mais antigos no planeta faz com que se admita que a eles se deve a atmosfera tal como a conhecemos, rica em oxigénio (Velázquez, 2005), possibilitando assim a origem de inúmeras formas de vida (Jochem, 2002).

As cianobactérias são também designadas por azuis-verdes por serem as cores das primeiras espécies identificadas. Sabe-se hoje em dia que as cores destes organismos

variam entre o verde-amarelado, verde-azulado, verde-cinza e vermelho (Schubert *et al.*, 2003 citando Prescott, 1999). As diferentes cores ficam a dever-se à presença de clorofilas:

-de cor azul – clorofila-*a* com ficobilinas (proteínas)

-de cor verde brilhante – combinação de clorofila *a* e *b*

Quando as condições de temperatura, luminosidade e disponibilidade de nutrientes são favoráveis ao desenvolvimento de fitoplancton, algas e cianobactérias podem multiplicar-se com facilidade. Há no entanto, que ter em consideração o facto de que factores vantajosos a uma espécie não são necessariamente os que mais favorecem outra. Segundo Oliver e Ganf (2000) a *Microcystis aeruginosa* pode coexistir com a *Anabaena flos-aquae*, mas não com a *Oscillatoria rubescens*. Estas diferenças nas condições óptimas estão naturalmente associadas as diferenças estruturais, fisiológicas e ecológicas entre as espécies.

Quando estes organismos existem em grande número, dispersos pela massa de água, é normal que ocorra um aumento da turvação da mesma. No entanto, algumas espécies de cianobactérias tendem a acumular-se à superfície numa camada densa e esverdeada. Quando esta proliferação é limitada a número um relativamente reduzido de espécies, está-se na presença de um *bloom* ou florescência.

Segundo Vasconcelos (1999), em Portugal existem registos desde os anos 30 da presença de cianobactérias em lagos naturais, reservatórios e rios com correntes muito baixas (Sampaio, 1933, Nauwerck, 1962, Oliveira, 1984 e Santos e Mesquita, 1986).

A avaliação da distribuição de cianobactérias tóxicas em águas naturais começou em 1989, e de 1989 a 1992 estudou-se a ocorrência de cianobactérias tóxicas. Foram analisadas 30 amostras de *blooms* de 30 locais como lagos, reservatórios e rios. As espécies dominantes foram a *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Anabaena flos-aquae*, *A. scheremetievi* e *Aphanizomenon flosaquae*. Enquanto a *Microcystis* forma colónias a *Anabaena* e a *Aphanizomenon* formam agregados filamentosos (Oliver e Ganf, 2000).

Schindler (2006) refere-se a Schindler (1977) para evidenciar o facto de as cianobactérias saírem favorecidas, relativamente a outras espécies de algas, para situações em que a razão N:P é baixa, já que algumas destas apresentam a capacidade de fixar azoto atmosférico. A escassez de nutrientes estimula, por outro lado, o armazenamento dos nutrientes não limitantes que existem no meio. Esta acumulação permite que as células utilizem grupos de nutrientes que estejam desfasados temporal e/ou espacialmente (Oliver e Ganf, 2000).

Muitos são os tipos de algas que provocam a formação de *blooms*, mas os mais comuns estão normalmente associados a um rápido aumento de células de cianobactérias. Ainda que muitos *blooms* sejam inofensivos, podem surgir situações de perigo derivadas da presença de toxinas, substâncias químicas ou organismos patogénicos que podem levar à

morte de organismos aquáticos ou provocar problemas ao nível da saúde humana (MRACC, 2002). Segundo Saqrane *et al.* (2007), muitos autores observaram uma diminuição na abundância de espécies de macrófitas em lagos eutrofizados em que ocorrem *blooms* de cianobactérias (Weiss e Liebert, 1998, Weiss *et al.*, 2000, Mitrovic *et al.*, 2004, LeBlanc *et al.*, 2005, Jang *et al.*, 2007, Yamasaki, 1993, Pflugmacher *et al.*, 1998, Rowmanowska-Duda e Tarczynska, 2002, Chen *et al.*, 2004). A redução de oxigénio que as florescências potenciam e as toxinas produzidas favorecem a diminuição da biodiversidade nos sistemas aquáticos.

Muitas vezes, as baixas concentrações de toxinas no meio não são letais possibilitando assim uma acumulação destas nos animais expostos. Dependendo do local onde se acumulam e do animal em causa, estas cianotoxinas podem ser transferidas ao longo da cadeia alimentar, por exemplo através do consumo de moluscos e peixes (Vasconcelos, 1999).

São frequentes os casos de alergias a algas e cianobactérias referidos como “evidência accidental” da existência de águas eutróficas. É importante referir que nem todas as reacções alérgicas se devem a toxinas de cianobactérias. No entanto, a existência de uma elevada concentração celular destes organismos na massa de água leva a que os efeitos que se façam sentir, lhes sejam imputados (Bartram, 1998).

Estes organismos tendem por vezes a ascender à superfície da massa de água conferindo um aspecto desagradável devido à tonalidade azulada ou esverdeada que provoca a formação de escumas e a produção de odores. Estas situações são identificadas como um problema que inclui perdas económicas e ambientais (Osswald *et al.*, 2007).

Durante o século XX, fenómenos como o desenvolvimento excessivo de cianobactérias e plantas macrófitas em consequência do enriquecimento em nutrientes das massas de água, o aumento da ocorrência de espumas e as mortes periódicas de peixes, foram sintomas difíceis de ignorar, sendo reconhecidos como um problema por quem vive na dependência dos sistemas hídricos, para os seus mais diferentes usos (Schindler, 2006).

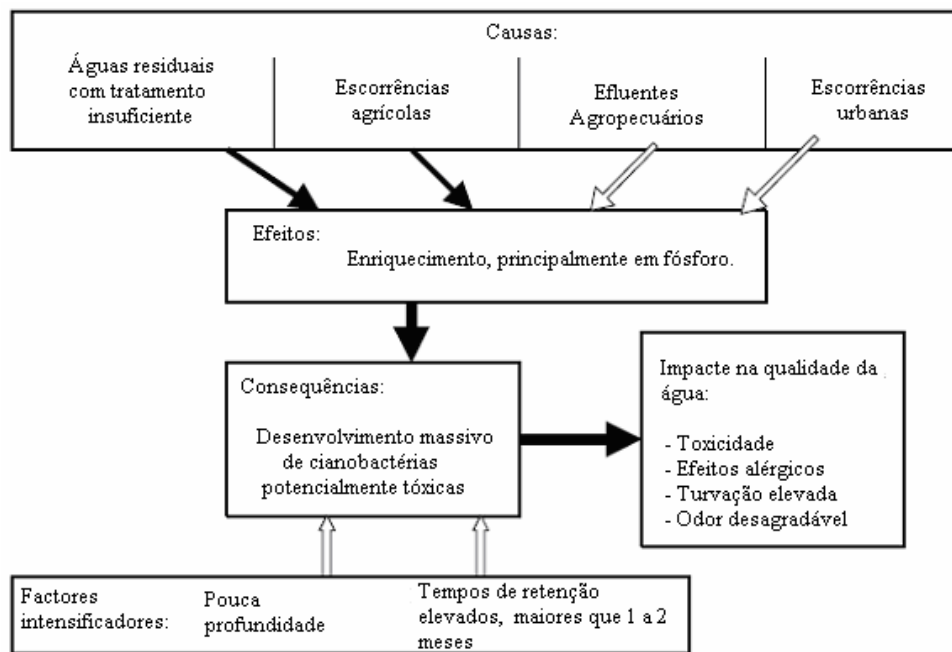


Figura 8 – Esquema de ocorrência de florações de cianobactérias: Suas causas e consequências

Fonte: Bartram, 1998 (adaptado)

As florações de cianobactérias em massas de água utilizadas para produção de água para consumo humano acarretam, além da toxicidade, uma série de dificuldades associadas principalmente à remoção de cheiros e gostos da água, já que implicam a utilização de uma linha de tratamento mais complexa. Do ponto de vista ambiental, os *blooms* densos, além de promoverem um elevado consumo do oxigénio disponível, impossibilitam a penetração da radiação solar na coluna de água dificultando a manutenção da diversidade faunística e florística no ecossistema (MRACC, 2002).

Na Figura 8 apresenta-se um esquema dos factores causadores e intensificadores de florações de cianobactérias em sistemas naturais. Através dele pode perceber-se que as causas devem ser tidas como ponto de partida na resolução do problema, ainda assim, as consequências apresentadas devem ser minimizadas, ao longo de todo o processo.

Se por um lado Schubert *et al.* (2003) referiam que as florações podem ou não ser tóxicas, de acordo com a espécie de cianobactéria presente, já Bartram, (1998) afirma que a toxicidade nem sempre é uma característica que defina uma espécie, e que o que acontece normalmente é que cada espécie pode apresentar-se sob a forma de estirpe tóxica ou não tóxica.

Ainda que a toxicidade e a possível predominância das estirpes tóxicas sobre as não tóxicas não estejam claramente explicadas, pode justificar-se pelo facto de a produção de toxina

constituir uma vantagem face aos predadores de fitoplancton. Daí a importância da avaliação das espécies de cianofíceas nos sistemas hídricos estar associada aos compostos tóxicos que estas podem libertar e que afectam a potabilidade da água. O porquê da produção de toxinas por parte das cianobactérias é ainda um mistério, e a resolução desta questão pode ser uma mais valia no controlo da produção destes compostos.

Segundo o MRACC (2002), determinadas espécies de cianobactérias produzem venenos poderosos com efeitos letais até para concentrações reduzidas. Patockaa e Stredab (2002) definem as cianotoxinas como mais agressivas que os agentes químicos tradicionais, o que faz delas um problema aquando da utilização das massas de água.

As principais formas de intoxicação, tanto de animais como humanos incluem normalmente perturbações hepáticas, neurológicas, gastrointestinais e reacções alérgicas (Schubert *et al.*, 2003), no entanto os efeitos dependem do tipo de toxina e das condições do organismo atingido.

As toxinas produzidas por cianobactérias são classificáveis, de acordo com o modo como actuam, em Neurotoxinas (anatoxinas), Hepatotoxinas (microcistinas) e irritantes ao contacto (Schubert *et al.*, 2003 citando Carmichael, 1992).

De acordo com a velocidade com que actuam, as toxinas podem ser distinguidas em dois grupos distintos. Segundo Chorus & Bartram (1999) as neurotoxinas são alcalóides ou organofosforados neurotóxicos que se caracterizam por causar a morte por paragem respiratória de uma forma rápida e mesmo após poucos minutos de exposição. Por outro lado, as hepatotoxinas actuam mais lentamente podendo no entanto conduzir à morte, de poucas horas a poucos dias, e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos.

Segundo Patockaa e Stredab (2002), o grupo das neurotoxinas naturais é importante pela estrutura química única dos seus compostos e pelos seus poderosos efeitos biológicos. Independentemente da forma de actuar, as neurotoxinas são letais, no entanto desconhece-se a relação, se é que esta existe, entre morte de seres humanos e o uso em recreio de água contaminada (Bartram, 1998).

De acordo com Azevedo (1998) as neurotoxinas são produzidas por espécies dos géneros *Anabaena* (Carmichael *et al.*, 1990), *Aphanizomenon* (Mahamood e Carmichael, 1986), *Oscillatoria* (Sivonen *et al.*, 1989), *Trichodesmium* (Hawser *et al.*, 1991) e *Cylindrospermopsis* (Lagos *et al.*, in press).

As situações de intoxicação mais comum envolvendo cianobactérias são devidas normalmente às hepatotoxinas que provocam hemorragias intra-hepáticas de que resulta elevada perda de sangue que conduz a um choque hipovolémico (Azevedo, 1998 citando

Carmichael e Schwartz, 1984 e Beasley *et al.*, 1989). Estas situações são normalmente acompanhadas de sintomas como dor abdominal e prostração, anorexia, vômitos e diarreia (Azevedo em Schubert *et al.*, 2003).

As espécies identificadas como produtoras de hepatotoxinas pertencem aos géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (Azevedo 1998 citando Carmichael, 1992).

Segundo Schubert *et al.* (2003), o fígado é um dos órgãos mais afectados pelas toxinas pelas suas funções em reacções metabólicas principalmente ao nível da transformação de substâncias químicas no organismo. Os impactos no fígado podem ir das alterações bioquímicas e enzimáticas até lesões morfológicas com danos do metabolismo ou da estrutura celular, que podem ser irreversíveis. Estas alterações podem não revelar lesão morfológica mas indiciar no entanto lesão subclínica ou descarga enzimática sem agressão celular quando não se manifestam sintomas de doença hepática.

As toxinas irritantes ao contacto provocam, como o próprio nome indica, irritações da pele e mucosas, além de sintomas alérgicos (Chorus e Bartram, 1999). Estas situações ocorrem normalmente através de banhos e/ou actividades recreativas em massas de água com elevado número de organismos produtores deste tipo de tóxicos.

Outro tipo de toxinas produzidas por cianobactérias, são as citotoxinas, que provocam desde gastroenterites a doenças hepáticas. Estas enzimas estão normalmente associadas a organismos da espécie *Cylindrospermopsis raciborski* (Braga, 2004).

Bartram, (1998) refere-se à cilindrospermopsina como um alcalóide que bloqueia a síntese proteica, daí que os primeiros efeitos são os danos no fígado e rins. Ao contrário da toxina pura, os extractos podem ainda provocar danos nos pulmões, glândulas supra-renais e intestinos. A identificação do sistema causa-efeito não é imediata porque os sintomas clínicos aparecem normalmente alguns dias após a exposição.

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* é um organismo tipicamente tropical e sub-tropical, ainda que, segundo Bartram (1998) cada vez mais haja tendência para que estejam presentes em regiões temperadas (citando Padisák, 1997), pois foram identificados *blooms* em locais como Viena de Áustria (citando Roschitz, 1996) e Alemanha (citando Wiedner, com. pessoal).

Como se pode prever, tendo em conta a variedade de toxinas existentes, a toxicidade dos *blooms* de cianobactérias pode assumir diferentes formas, assim pode ocorrer durante curtos períodos de tempo ou ser sazonal, mas pode variar também em termos espaciais. Segundo Yunes (1996) não parece haver uma relação directa entre o aumento de biomassa em suspensão e a ocorrência de toxicidade, já que numa florescência é possível encontrar espécies tóxicas e não tóxicas de cianobactérias. Esta variabilidade, associada à dificuldade

que existe na identificação da toxicidade das diferentes espécies, conduz a uma necessidade premente de acompanhamento e controlo dos *blooms* de forma a evitar situações problemáticas (Braga, 2004).

Segundo Azevedo (1998), este comportamento é devido à diferente proporção de organismos tóxicos e não tóxicos na população, no entanto, esta irregularidade de comportamento não se encontra bem definida. Admite-se, no entanto, que são cada vez mais frequentes os *blooms* tóxicos, já que das florações amostradas e testadas em diferentes países, cerca de 50% apresentaram toxicidade demonstrada em ensaios biológicos (Azevedo, 1998 citando Carmichael e Gorham, 1981, Repavich *et al.*, 1990, Sivonen *et al.*, 1990, Lawton e Cood, 1991, Watanabe *et al.*, 1991, Costa e Azevedo, 1995).

Segundo Azevedo (1998) os principais sintomas de intoxicação de animais e seres humanos por agentes produzidos por cianobactérias, incluem distúrbios hepáticos, neurológicos, gastrointestinais e reacções alérgicas. Ainda que exista maior número de casos identificados no hemisfério norte, admite-se que estas situações de intoxicação ocorram por todo o globo - com consequências para humanos registados na Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (Falconer, 1994). As situações registadas podem ter-se ficado a dever, não a uma maior taxa de ocorrência, mas a um maior investimento na tentativa de identificar as causas de intoxicação, ou mesmo uma maior preocupação face à toxicidade dos meios aquáticos.

Segundo Bartram (1998), existem inúmeros registos de casos de envenenamento mortal de animais através de água com excesso de cianobactérias. O primeiro caso registado, no século XIX, diz respeito a uma intoxicação de gado que bebeu água de um lago fortemente contaminado com cianobactérias. Desde aí surgiram registos de envenenamento de ovinos, bovinos, equinos, suínos, cães, peixes, roedores, anfíbios, aves aquáticas, morcegos, zebras e rinocerontes (Codd *et al.*, 1999).

Se por um lado existem numerosos casos letais de intoxicação de animais por ingestão de cianobactérias presentes na água, a morte de seres humanos apenas foi reportado uma vez e envolveu doentes renais. São conhecidas no entanto situações esporádicas de irritações ao nível da pele e mucosas ou de doenças associadas à ingestão de água contaminada ou inalação de espumas. De uma forma geral os sintomas consistem em desconforto abdominal, náuseas, vómitos, diarreias, dores de garganta, tosse seca, dores de cabeça, aftas, pneumonia atípica, elevado número de enzimas hepáticas no soro, enjoos, fadiga e irritações de pele e olhos pelo que podem dificultar um diagnóstico (Bartram, 1998).

O baixo número de casos registados pode-se dever à falta de conhecimento sobre a toxicidade de cianobactérias, pelo que nem os médicos nem os doentes possam facilmente associar os sintomas à verdadeira causa de intoxicação (Bartram, 1998).

Ainda que reduzidos, os casos de exposição a populações de cianobactérias devem ser evitados a todo o custo, e é com este objectivo que Bartram (1998) sugere medidas de curto e de longo prazo. A curto prazo, a medida mais importante é informar o público alvo sobre os potenciais riscos para a saúde que as cianobactérias podem provocar, dando ainda a conhecer os sintomas causados pela exposição. Estes avisos podem ser dados através dos meios de informação – média, acompanhando os regulares relatórios de qualidade da água e/ou junto da massa de água contaminada. As medidas de longo prazo visam minimizar os riscos causados por algas tóxicas. A ideia não é proibir a utilização de zonas para recreio, mas sim garantir a manutenção ou restabelecimento da qualidade dos sistemas hídricos, principalmente no que toca à transparência – mais de 2m no método do disco de *Secchi* - e teores de fósforo – abaixo de 10 µg de P /L – evitando assim o favorecimento de *blooms* tóxicos.

Estes valores são difíceis de alcançar em locais sujeitos a descargas de nutrientes, pelo que se recomenda a identificação das fontes poluidoras e desenvolvimento de metodologias com vista a resolução do problema de eutrofização (Bartram, 1998 citando Chorus e Mur, 1998).

Este processo de eliminação das fontes poluidoras nem sempre é fácil já que existem muitas fontes difusas, principalmente no que toca aos efluentes agrícolas, mas existem ainda outras fontes difusas de nutrientes como as escorrências florestais, as provenientes de zonas impermeabilizadas, como é o caso das zonas urbanizadas, e as descargas de efluentes domésticos não controlados.

Importa ter em conta que a presença de algas por si só não é um problema para o tratamento de água, no entanto as suas características podem implicar a necessidade de uma série de procedimentos extra. As algas alteram a cor, o sabor, o odor e o pH da água, podendo assim encarecer o tratamento nas ETA, já que estão normalmente associadas a problemas de corrosão, colmatação de filtros e dificuldades na decantação química (Di Bernardo, 1995 em Schubert *et al.*, 2003).

Sabendo isto, é fácil de compreender que a água utilizada na produção de água para consumo humano seja captada a uma profundidade suficiente para que a falta de luz funcione como inibidor da presença de cianobactérias.

Se por um lado nas ETA os microrganismos patogénicos existentes na água bruta são eliminados através de tratamento convencional, o mesmo não acontece com as cianobactérias. Caso o tratamento seja inadequado, estes organismos podem ser levados a libertar toxinas que ao permanecerem na rede de abastecimento, vão acarretar muito provavelmente importantes problemas de saúde pública (Schubert *et al.*, 2003).

Propostas de intervenção para controlo da eutrofização e seus efeitos

Até aos anos 60s acreditava-se que situação interna de poluição dos sistemas tornava os lagos irrecuperáveis de forma permanente. No entanto, ao longo dos anos 70 e 80, muitos estudos foram elaborados mostrando que a carga de nutrientes a que está sujeito o lago, influencia de diferentes formas a recuperação destes face à eutrofização.

Estas situações permitiram o desacreditar de teorias que afirmavam que uma vez eutróficos, os lagos seriam irrecuperáveis. E é nesta perspectiva de restabelecimento, que devem assentar ainda hoje as medidas de gestão e recuperação de massas de água, integrando ainda a sua bacia hidrográfica.

Em 1970s era claro que as alterações dos usos de solo, assim como fontes de poluição pontuais, introduziam importantes quantidades de nutrientes nos lagos. Estudos mostravam ainda que a conversão de terrenos florestais em pastagens aumentavam a perda de nutrientes (Schindler, 2006 citando Dillon e Kirchner, 1975) assim como a alteração de paisagens naturais para solos agrícolas e/ou urbanizados tiveram implicações para o acelerar de processos de degradação (Soranno *et al.*, 1996 e Jeppesen *et al.*, 1999). Compreende-se então que Schindler (2006) afirme que o controlo de fontes de fósforo reduz florescências de algas em muitos lagos, implicando um particular esforço no controlo das fontes difusas de nutrientes ao nível da bacia hidrográfica, na gestão e reabilitação destes.

No início, o combate à eutrofização assentava na utilização de herbicidas em vez de actuarem na fonte do problema. Só mais tarde os cientistas começaram a relacionar os *blooms* de algas com o aumento dos teores nutricionais, possibilitando avanços no controlo da eutrofização num plano mais preventivo. Foi nesta perspectiva que o controlo da produção de detergentes fosfatados e das descargas pontuais de águas residuais nos anos 70s se tornou uma vitória, não correspondendo ainda assim ao fim da eutrofização. As fontes difusas como escorrências agrícolas, e a reciclagem de fósforo ao nível dos sedimentos continuaram a ser um problema sem resolução (Schindler, 2006).

Ainda que a actividade agrícola tenha um impacto significativo no que toca ao enriquecimento, também as águas residuais domésticas são de ter em conta. Nem todas as descargas das zonas urbanas estão hoje sujeitas a drenagem e tratamento de esgotos. Por outro lado, a elevada área impermeabilizada possibilita o escoamento de forma difusa para os meios naturais receptores, constituindo também esses, uma considerável fonte de N e P (Schindler, 2006 referindo Cairns, 1995). Infelizmente, a redução destas fontes é muito mais complicada que a de fontes pontuais, já que estas últimas são abrangidas pela legislação (DL nº 152/97 de 19 de Junho e DL nº236/98 de 1 de Agosto) além de que são mais fáceis de identificar. Ainda assim, Jeppesen *et al.* (1999) afirmam que a aposta em melhores praticas agrícolas, a recuperação de zonas húmidas e áreas ribeirinhas e a reparação de ribeiras canalizadas permitem o avanço no combate às fontes de poluição difusa.

Segundo Schubert *et al.* (2003), o sulfato de cobre e o cloro eram utilizados no combate à presença de algas em albufeiras e estações de tratamento. Em particular o sulfato de cobre era bastante utilizado, mas o facto de promover a morte celular e consequente libertação de toxinas implicaria uma atenção especial no que toca às concentrações utilizadas. Ainda que no mesmo estudo seja referido que o sulfato de cobre era recomendado na ordem de 1ppm (citando CETESB, 1973), existem casos em que o agente com vista à eliminação de algas em lagoas era utilizado em concentrações finais de até 250ppm (Burnett *et al.*, 1994).

O principal procedimento deverá ser a defesa dos meios aquáticos. A eliminação das cianobactérias pode ser conseguida através da diminuição da estratificação e da redução dos nutrientes disponíveis, sejam eles provenientes dos sedimentos ou das escorrências afluentes ao sistema. Não se deve recorrer a qualquer tipo de tratamento com algicidas, já que estes levam à destruição das células dos organismos responsáveis pelo *bloom* podendo acarretar a libertação de toxinas para o meio aquático (Azevedo, 1998).

No que toca às técnicas de tratamento de água, estas podem ser bastante eficazes na remoção de células de cianobactérias assim como de microcistinas, desde que seja utilizada uma eficaz combinação de tecnologia adequada. As cianotoxinas que permanecem dentro das células podem ser facilmente removidas por processos de coagulação e/ou filtração presentes numa linha de tratamento convencional. As microcistinas podem também ficar adsorvidas em carvão activado (Braga, 2004).

Processos de filtração, floculação e coagulação, precipitação e flotação podem no entanto promover a destruição das células com consequente libertação de elevadas quantidades de toxinas. As toxinas cianobacterianas dissolvidas não são visíveis e tendem a causar intoxicações de animais e até humanos. A eliminação destas toxinas da água implica procedimentos físico-químicos de forma a remover a sua toxicidade. O cloro é pouco eficiente e a radiação U.V. é ineficaz na remoção de toxinas dissolvidas, já a ozonização e a nanofiltração são considerados processos eficientes (Teixeira e Rosa, 2006).

Estudos mostram que a eficiência de algumas linhas de tratamento de água em Portugal é inferior a 24% na remoção de células (Oliveira e Monteiro, 1992). São referidos como exemplos os reservatórios eutrofizados de Agueira e Monte Novo (Vasconcelos, 1999).

Elevados teores de cloro ou cloramina são eficazes na destruição de microcistinas (Nicholson *et al.*, 1994) no entanto a possibilidade da formação de trihalometanos leva a que o uso de cloro implique a remoção prévia da matéria orgânica presente na água (Vasconcelos *et al.*, 1996).

O carvão activado em pó também é utilizado na adsorção de contaminantes como as cianotoxinas. As dosagens deste são dependentes da qualidade da água e variam normalmente entre os 10 e 40mg/L. Para remover microcistinas o carvão deverá ter um grande volume de mesoporos, poros com 2 a 50nm de diâmetro e microporos secundários

com 0,8 a 2 nm de diâmetro (Rosa *et al.*, 2007 citando Donati *et al.*, 1994 e Pendleton *et al.*, 2001). As lamas resultantes deste tratamento devem ser armazenadas durante um período de tempo que permita a biodegradação das toxinas removidas.

A utilização de carvão activado granulado permite, ao contrário do carvão em pó a regeneração do carvão. Além disso possibilita a remoção de cianotoxinas mas também de material particulado como cianobactérias (Rosa *et al.*, 2007 citando Costa *et al.*, 2004).

Segundo Chorus e Bartram (1999), os processos de separação por membranas, particularmente a microfiltração com remoção de material particulado superior a 1µm, e ultrafiltração, com remoção de partículas com diâmetro superior a 0,05µm, são efectivos na remoção de cianobactérias e toxinas intracelulares. Estudos realizados à escala laboratorial, com módulos planos de ultrafiltração e microfiltração, demonstraram eficiências de remoção superiores a 98% (Teixeira, 2001).

A nanofiltração remove as cianotoxinas, para além de constituir uma barreira segura à passagem de cianobactérias, bactérias e vírus, e promove a remoção de matéria orgânica natural e seus derivados, bem como micropoluentes orgânicos como pesticidas e disruptores endócrinos. Esta remoção de matéria orgânica natural diminui o uso de desinfectante e potencial formação de trihalometanos, para além de contribuir para a estabilidade microbiológica da água na adução e distribuição (Rosa *et al.*, 2004).

Segundo Bartram (1998) é pouco provável que se tenham identificado todos os tipos de toxinas que produzem efeitos negativos na saúde humana, pelo que é necessário que se continue a apostar na investigação nesta área, para que se conheça o mais possível, minimizando assim os riscos de intoxicação.

É esta falta de informação concreta no que toca às toxinas e seus potenciais efeitos, que conduz à necessidade de que os reservatórios de água sejam controlados, principalmente os que têm objectivos de produção de água para abastecimento público. Importa controlar o seu potencial risco de contaminação por toxinas associadas à ocorrência de *blooms*. Perceber se as cianotoxinas são libertadas apenas por lise ou morte celular e se sim, até que ponto a idade das florações tem consequências mais ou menos graves no que toca à saúde humana. Implica ainda perceber se o processo de tratamento de água contempla a ocorrência de florações na água bruta e se a linha de tratamento se adequa à necessidade de remoção dos compostos tóxicos libertados.

O decreto-lei 306/2007 de 27 de Agosto define, como valor para efeito de controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano, 1µg/L de microcistinas. Este parâmetro deve ser determinado à saída da estação de tratamento de água, quando existam suspeitas de eutrofização da massa de água superficial.

Importa acima de tudo reter que qualquer abordagem sobre um sistema aquático, com vista a resolução de processos de eutrofização com implicações no processo de tratamento de água, deve ser feita de forma abrangente, para que não se actue apenas a um nível pontual, mas à escala de bacia hidrográfica, actuando assim a montante do problema que é a presença de cianobactérias e toxinas nas massas de água.

É nesta abordagem global do sistema que os 5 princípios base de Boavida (2001) devem ser tidos em conta. Em primeiro lugar há que ter noção de que um ecossistema é constituído por organismos vivos (produtores, consumidores e decompositores) que criam relações entre si e com o meio ambiente em que se inserem; Em segundo, os nutrientes cumprem uma espécie de ciclo em que são transferidos dos organismos para o ambiente físico-químico, e deste de novo para os organismos. Estes fluxos podem ocorrer ao nível do ecossistema, mas podem também estender-se aos ecossistemas relacionados, permitindo assim uma contínua reciclagem dos compostos químicos.

O terceiro princípio afirma que tudo nos ecossistemas se faz à custa de transformações energéticas. Relembra ainda que pelas leis da termodinâmica, ainda que nenhuma energia seja criada ou destruída, mas que ocorra sempre uma transformação de uma forma noutra, nenhuma transformação de energia apresenta 100% de rendimento, já que existem sempre perdas sob a forma de calor.

No quarto princípio é referido que a energia necessária ao ecossistema pode vir da fotossíntese através de transferências ao longo da cadeia trófica ou indirectamente através da decomposição de detritos; Verifica-se portanto que em última análise, toda a energia é proveniente da radiação solar. Por último, tudo o que é lançado nos ecossistemas entra nos ciclos naturais dos elementos e potenciam a ocorrência de situações desastrosas para o ecossistema.

Medidas como o arejamento, a predação de macrófitas e biomanipulação foram aplicadas na tentativa de remediar o processo de degradação, reduzindo a carga interna e/ou acelerando a remoção de fósforo (Schindler, 2006 citando Cooke *et al.*, 1993 e Keto *et al.*, 2004). Também no trabalho de Boavida (2001) são referido métodos de controlo de eutrofização como o arejamento do fundo dos lagos (citando Mcqueen e Story, 1986) até complicados processos de biomanipulação em que se modificam as populações biológicas (citando Hrbáček *et al.*, 1961).

Também em Santos *et al.* (2005), é referido que no sentido de diminuir a carga interna de fósforo registada durante os períodos de estratificação térmica, foi instalado em Abril de 1995 um sistema de arejamento e circulação artificial da massa de água da Lagoa das Furnas. A ausência de episódios de estratificação manteve-se durante os períodos de Primavera/Verão de 1995 a 1997.

O MRACC (2002) refere medidas como a minimização das escorrências contaminadas com fertilizantes e pesticidas, tentativas no que toca a manter os animais selvagens longe de reservas de água eutrofizada e a diminuição dos nutrientes, luz ou temperatura, já que estes são os parâmetros primordiais ao seu desenvolvimento. É referido como exemplo que a velocidade a que a água se movimenta é uma forma importante de controlar a luz e os nutrientes disponíveis.

Como é do conhecimento comum, a existência de água num sistema ambiental é importante tanto para os ecossistemas como para utilização humana. Além de fonte de água pura servem de sustentação aos organismos aquáticos, a água das albufeiras de barragem são ainda utilizadas para rega ou aproveitamento hidroeléctrico, podendo eventualmente ser utilizadas numa vertente recreativa.

Além das diferenças de usos, é importante perceber que os lagos são todos diferentes entre si. Pela sua morfometria, tempo de residência da água, idade, hidrodinâmica, penetração da radiação solar, temperatura e pH da água, entrada de nutrientes (Boavida, 2001) daí que a aplicação de soluções deva ser caso a caso, já que nenhuma metodologia é globalmente ajustável.

As medidas preventivas são de longe as mais eficazes, no entanto o sucesso dos métodos referidos varia de acordo com o lago em questão, já que os seus custos podem torná-los impraticáveis em lagos de grandes dimensões, sem esquecer também que toda e qualquer acção deve implicar uma aposta na redução dos *inputs* de nutrientes, já que a adopção simples de outras medidas não atingem os objectivos à mesma escala.

As estratégias, a adoptar no controlo e combate à eutrofização, devem ser discutidas e definidas de acordo com as características específicas de cada lagoa. Esta necessidade prende-se com o facto de que além do teor de nutrientes que afluem à lagoa, importa considerar o papel que factores como, a luz, a temperatura, a hidrologia, a mistura da coluna de água e a morfologia da bacia têm no processo de degradação. É também de interesse o acompanhar da evolução do problema através de campanhas de monitorização periódicas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem e preparação das amostras para ensaio

A recolha do fitoplâncton da Lagoa das Furnas (S. Miguel – Açores) foi efectuada em Maio e Julho de 2007, em que as cianobactérias correspondiam a cerca de 95% do fitoplâncton da lagoa. As amostras foram recolhidas com rede de 0,45µm e porções das mesmas inoculadas em Meio BG11, meio selectivo para cianobactérias (Rippka *et al.*, 1979).

O meio de cultura BG11 modificado foi preparado conforme apresentado no Anexo I, distribuído por frascos, em volumes de 200ml, e autoclavado a 121°C durante 20 minutos.

A inoculação consistiu na adição a cada frasco de meio de pequenos volumes de amostra de fitoplâncton de forma a permitir a manutenção e desenvolvimento preferencial de cianobactérias presentes nas amostras recolhidas. Os recipientes foram rolhados com gaze e algodão, possibilitando assim a entrada de ar, e mantidos à temperatura ambiente e em condições de boa luminosidade.

3.2. Ensaio de crescimento de cianobactérias em cultura mista

Os ensaios realizados consistiram na adição de diferentes concentrações de azoto amoniacal ou nitratos, para uma concentração fixa de fósforo, acompanhando-se depois o crescimento das culturas ao longo do tempo.

Os ensaios foram realizados com adição de duas formas azotadas em concentrações de 0,5, 1 e 2,5 mg/L de N. Paralelamente a estes existiam duplicados para as mesmas concentrações. Foram realizados ainda ensaios testemunha, sem qualquer adição de azoto.

Assim sendo, os ensaios podem distinguir-se da seguinte forma:

- T – Testemunha, sem adição de azoto;
- 0,5NH₄ – Adição de 0,5mg de NH₄/L;
- 1NH₄ - Adição de 1mg de NH₄/L;
- 2,5NH₄ – Adição de 2,5mg de NH₄/L;
- 0,5NO₃ – Adição de 0,5mg de NO₃/L;
- 1NO₃ – Adição de 1mg de NO₃/L;
- 2,5NO₃ - Adição de 2,5mg de NO₃/L.

Os ensaios decorreram em câmara de cultura Fitoclima 4600 – ARALAB, regulada para 18°C e 22º C de temperatura nocturna e diurna respectivamente. O fotoperíodo teve a duração de 12h.

Diariamente as culturas eram sujeitas a uma avaliação do número de partículas em suspensão e medição do pH do meio. Este era corrigido para valores situados entre 7,5 e 8, sempre que necessário.

No último dia dos ensaios, além dos procedimentos diários, foram avaliados parâmetros como as concentrações de azoto e fósforo remanescentes nos meios de cultura, assim como de clorofila-a e feopigmentos existentes.

3.2.1. Preparação do meio de cultura (Meio Hoagland)

Para a realização dos ensaios de crescimento de cianobactérias em cultura mista utilizou-se uma solução nutritiva, o meio Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) cuja composição é apresentada no Quadro 3.

Quadro 3 – Composição do Meio Hoagland

Composição	Massa (g) de sal por volume (L) de solução	Tomas da sol. Stock para 1L (mL)
Nutrientes		
KCl	149,112	1
CaCl ₂	44,396	5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	39,42	5
KH ₂ PO ₄	4,3937	0,075
K ₂ HPO ₄	5,6235	0,015
NaCl	58,44	0,5
H ₃ BO ₃	1,425	2
MnSO ₄ .H ₂ O	0,765	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04	2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,020	2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,110	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125	2
Solução de Fe-EDTA		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1/100 ml	1
EDTA Na ₂ . 2H ₂ O	1,4835/100 ml	

A solução de Fe-EDTA foi preparada em separado, dissolvendo o EDTA Na₂ · 2H₂O e o FeSO₄ · 7H₂O em dois recipientes distintos. De seguida adicionou-se a segunda solução à primeira mantendo sempre a agitação. O pH da solução foi mantido entre os 5,5 e os 6,5.

A quantidade de fósforo presente no Meio Hoagland (30µg/L) aproxima-se da concentração média de fósforo existente normalmente na água da Lagoa das Furnas.

A adição de azoto foi conseguida através de soluções de sais azotados, tendo-se optado pelo cloreto de amónio – NH₄Cl e pelo nitrato de sódio – NaNO₃.

3.2.2. Inoculação

Para se conseguir obter o maior número de células no menor volume possível de BG 11, recorreu-se à centrifugação. O meio de cultura BG11 previamente inoculado foi centrifugado durante 10 minutos a 2500rpm.

Recorrendo a uma pipeta de Pasteur, retirou-se e rejeitou-se o sobrenadante e promoveu-se a ressuspensão dos aglomerados através da adição de pequenos volumes de meio Hoagland.

Após ressuspensão, as células previamente centrifugadas foram utilizadas na inoculação do Meio Hoagland esterilizado.

3.2.3. Adição de nutrientes

Efectuaram-se ensaios em branco em que as culturas foram mantidas sem adição de azoto, os ensaios Testemunha.

O Quadro 4 indica de forma resumida a composição em nutrientes N e P das culturas utilizadas no ensaio experimental.

Quadro 4 - Quadro resumo do ensaio realizado

Cultura	Fósforo no meio	Adição de Azoto	
		NH ₄	NO ₃
Testemunha	30 µg/L	-	-
1	30 µg/L	0,5 mg/l	-
2	30 µg/L	1 mg/l	-
3	30 µg/L	2,5 mg/l	-
4	30 µg/L	-	0,5 mg/l
5	30 µg/L	-	1 mg/l
6	30 µg/L	-	2,5 mg/l

3.2.4. Acompanhamento do crescimento das culturas

Durante a realização dos ensaios, o crescimento das culturas foi acompanhado através de uma metodologia que permitiu a determinação da concentração de partículas em suspensão. Esta determinação do número ou volume de partículas em suspensão foi conseguida através da utilização do Multisizer™ 3 COULTER COUNTER®, que funciona de acordo com o princípio de Coulter.

Neste método as partículas passam por uma pequena abertura e induzem uma mudança de resistência entre os eléctrodos que se encontram um de cada lado. O processo resulta num impulso eléctrico proporcional ao volume das partículas que se encontram na coluna, permitindo uma análise da distribuição e tamanho das células convenientemente diluídas no electrólito (Kobayashi *et al.*, 2007). O uso do Coulter Multisizer permite uma grande resolução no que toca à medição de partículas de aerossóis na água, assim como a determinação da concentração de partículas com diversos intervalos de diâmetro.

A recolha das amostras foi efectuada sempre do mesmo modo, pipetando 1ml da solução da cultura e colocando-a numa célula do MCC à qual se juntou de seguida 9ml de electrólito para espécies de água doce – NaCl a 0,9%. Estas diluições são opcionais, sendo normalmente escolhidas de acordo com a densidade celular no meio ou com a quantidade de amostra disponível. Uma vez devidamente configurado, o software associado ao MCC permite o cálculo da concentração de partículas para qualquer grau de diluição.

Introduziu-se o eléctrodo do MCC na solução e após três contagens de partículas o software associado ao aparelho elaborou automaticamente um gráfico final com a média dos valores obtidos. Esta metodologia pode fornecer resultados de formas bastante distintas, no entanto optou-se pela representação gráfica do número de partículas em função do diâmetro das mesmas. Esta seria a representação mais vantajosa já que se trata de uma cultura mista, permitindo assim limitar o intervalo de diâmetros desejado.

Ao observar os resultados gráficos do Coulter Multisizer pode-se conseguir identificar uma curva de distribuição semelhante à normal ou a log-normal, sendo que esta última é a mais comum na natureza, correspondendo a uma distribuição normal, mas com um ligeiro desvio em relação à média (Crow e Shimizu, 1988). Se possível, a escolha do intervalo deve ser feita de acordo com essa curva, de forma a agregar o maior número de organismos de um intervalo válido.

Como nem sempre foi possível a obtenção dessa curva definida, e tendo em conta que os diâmetros das células de cianobactérias rondam os 5 μm , optou-se por um intervalo de contagem numa gama situada entre 3 a 7 μm . Sabendo que estes organismos tendem a agrupar-se em colónias, era importante que antes das leituras o meio de cultura fosse homogeneizado para que se garantisse uma boa dispersão das células.

Ainda que este método seja simples e claro, importa referir que todas as amostras recolhidas do meio de cultura são independentes e diferentes entre si, daí que cada recolha efectuada para determinação do teor de partículas em suspensão seja distinta de qualquer outra. Este facto impossibilita que numa repetição de contagem numa amostra, se obtenham os mesmos valores de concentração de partículas.

3.2.5. Determinações complementares

3.2.5.1. Determinação da concentração de clorofila-a e feopigmentos

Segundo Painting (2007), a determinação dos teores de clorofila-a e feopigmentos é utilizada como forma de quantificação indirecta da biomassa. Uma vez que este pigmento é comum a todos os organismos fitoplanctónicos (Dias, 2000), a determinação das concentrações de clorofila-a e feopigmentos foi realizada no final do ensaio como forma de estimar a quantidade de biomassa fitoplanctónica produzida. Esta determinação foi efectuada através do método de Lorenzen (1967).

Filtraram-se as amostras, sob vácuo, através de membranas de microfibras de vidro Whatman GF/F ou equivalente com porosidade nominal de 0,7 μm e 47mm de diâmetro. Os filtros com biomassa foram colocados em tubos graduados de centrifuga, encamisados para

evitar alterações nos valores da clorofila por exposição à luz, procedeu-se à adição de 5 ml de acetona a 90% e à maceração durante perto de um minuto. Adicionaram-se mais 4ml de acetona a 90% a cada tubo e cobriram-se com parafilme e papel de alumínio. Levaram-se ao frigorífico, a uma temperatura de aproximadamente 4°C, para que o processo de extracção decorresse durante toda uma noite.

O passo seguinte consistiu na centrifugação do conteúdo dos tubos, durante 20 minutos a 3000 rpm, para separação do filtro. O sobrenadante límpido obtido foi colocado numa célula do espectrofotómetro e efectuaram-se leituras de absorvência a 750nm e a 664nm. A primeira medição correspondeu à turvação das amostras e caso fosse elevada poderia indicar uma centrifugação pouco eficiente. A medição ao segundo comprimento de onda correspondeu ao pico de absorção da clorofila-*a*.

Acidificaram-se posteriormente os sobrenadantes para a degradação das clorofilas, e repetiram-se as medições, mas desta feita a 750 nm e a 665 nm. Esta segunda etapa de medições teve por objectivo efectuar a correcção dos valores de clorofila-*a* relativamente aos feopigmentos. O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro Pharmacia LKB - Ultrospec Plus.

Através da utilização das equações de Lorenzen (1967) (APHA, 1998) efectuaram-se as determinações de clorofila-*a* (1) e feopigmentos (2):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg.l}^{-1}\text{)} = \frac{26,7 * [(A_0 664 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] * V_1}{V_2 * L} \quad (1)$$

$$\text{Feopigmentos (mg.l}^{-1}\text{)} = \frac{26,7 * [1,7(A_0 664 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] * V_1}{V_2 * L} \quad (2)$$

Onde:

V_1 – Volume do extracto em L

V_2 – Volume da amostra filtrada em m³

L – Percurso óptico da célula em cm

$A_0 664$ e $A_0 750$ – Absorvências a 664nm e 750nm antes da acidificação

$A_a 664$ e $A_a 750$ – Absorvências a 664nm e 750nm após acidificação

Importa ainda ter em conta que o valor 26,7 corresponde à correcção da absorvência, isto é o produto do coeficiente de absorção da clorofila-a a 664 nm - 11,0 pela razão de correcção para a acidificação - 2,43 (APHA, 1998).

A relação $\frac{\text{clorofila}}{\text{feopigmentos}}$ permite ter uma ideia da idade dos organismos na cultura. Quanto

mais antigas as células maior os teores de feopigmentos em relação aos valores de clorofila-a encontrados nos mesmos extractos.

3.2.5.2. Determinação da concentração de Fósforo

Os parâmetros avaliados foram o fósforo total e total solúvel e os ortofosfatos. As determinações foram efectuadas por método colorimétrico (APHA, 1998). Os volumes de amostra utilizados foram 50ml de amostra para as determinações de P total e P solúvel e 25ml para a determinação dos ortofosfatos.

Para as determinações do fósforo total e total solúvel efectuou-se uma digestão prévia das amostras em frascos de 250ml com persulfato de amónio desidratado e ácido sulfúrico, em autoclave, à temperatura de 121°C durante 30 minutos. Após digestão as amostras foram arrefecidas e neutralizadas com NaOH na presença de solução indicadora de fenolftaleína. O conteúdo dos frascos foi transferido para balões 100ml e completado o volume com água destilada. Foram feitas tomas adequadas à concentração esperada, às quais se adicionou reagente colorimétrico. Após desenvolvimento de cor, efectuaram-se leituras a 880nm em espectrofotómetro Pharmacia LKB - Ultrospec Plus.

A determinação dos ortofosfatos foi feita através de método colorimétrico com ácido ascórbico. O método consiste na reacção do molibdato de amónio e tartarato de potássio e antimónio em meio ácido. Neste processo forma-se ácido fosfomolibdico que é reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdénio, que apresenta uma coloração intensa proporcional à quantidade de ortofosfato presente. Após neutralização das amostras, foi adicionado reagente colorimétrico às amostras e feitas medições de absorvência no espectrofotómetro a 880nm.

Foram analisadas tanto a amostra representativa das condições iniciais, o meio inoculado, como todas as culturas no último dia do ensaio. Esta avaliação permitiu estimar qual o consumo de fósforo em cada recipiente, mas também a possível conversão entre si, das diferentes formas em solução.

3.2.5.3. Determinação da concentração de Azoto

O azoto poderia existir nas amostras em três formas, azoto orgânico, amoniacal e nitratos.

A determinação de azoto total foi realizada pelo método de Kjeldhal com mineralização na presença de selénio como catalizador. Este método permite o doseamento do azoto orgânico e amoniacal em simultâneo, obtendo-se o azoto orgânico por diferença entre o azoto Kjeldhal e o amoniacal.

A mineralização dos compostos orgânicos foi realizada pelo ácido sulfúrico concentrado, a quente, na presença de elevada concentração de sulfato de potássio. As amostras foram preparadas e sujeitas a destilação em aparelho KJELTEC System 1026 Distilling Unit tecator. O destilado foi recolhido numa solução de ácido bórico com indicador e titulado com ácido clorídrico de concentração conhecida (APHA, 1998).

Os teores de azoto amoniacal foram determinados pelo método de Nessler que se baseia no desenvolvimento de uma cor amarela proporcional ao NH_4^+ presente. Esta cor, em baixas concentrações de azoto amoniacal, pode ser medida em espectrofotómetro a comprimento de onda 400-425nm. Para uma concentração perto de 10mg/L, a coloração aproxima-se do castanho-avermelhado pelo que deve ser determinada a 450-500nm de comprimento de onda (APHA, 1998).

Foi adicionado reagente de Nessler às amostras previamente filtradas, e após homogeneização e desenvolvimento de cor entre 10 a 30, procedeu-se à medição das absorvências correspondentes em espectrofotómetro Pharmacia LKB - Ultrospec Plus, ao comprimento de onda de 425nm.

Para a determinação dos nitratos utilizou-se a cromatografia líquida (HPLC), de acordo com a Norma ISO 10304:1992. A primeira parte desta norma define o processo de determinação de iões para águas pouco contaminadas, como é o caso das águas superficiais. As amostras foram filtradas antes de injectar no cromatógrafo DIONEX, modelo UVD 340S, equipado com sistema informático para análise dos dados.

3.2.6. Determinação do pH

Para contrariar qualquer variação brusca do pH nas culturas, efectuaram-se medições, através de método potenciométrico (aparelho Thermo Orion 920), com o objectivo de avaliar e corrigir, se necessário, o pH para valores próximos de 8, por adição de HCl ou NaOH.

4. Resultados

Ao longo dos 10 dias de duração dos ensaios observou-se que em todos os recipientes, sem excepção, aumentou o número de organismo pois o meio adquiriu progressivamente uma tonalidade verde amarelada.

Ainda que tratando-se de uma cultura mista, a observação microscópica permitiu verificar que os meios eram dominados por pequenas células, de cor amarela, pertencentes ao género *Microcystis*, muito abundantes nas amostras recolhidas na Lagoa das Furnas. Verificou-se ainda que as células tendiam a agregar-se em colónias, decantando muito rapidamente.

Os resultados apresentados representam a média dos resultados obtidos nos ensaios e respectivos duplicados. No Anexo II apresenta-se um quadro resumo com os resultados obtidos em todas as culturas.

4.1. Concentração de partículas em suspensão

No Quadro 5 são apresentados os resultados referentes à média da concentração das partículas dos ensaios efectuados em duplicado, ao longo de dez dias. Estas concentrações dizem respeito às partículas com diâmetro compreendido 3,02 e 7,07 μ m.

Quadro 5 - Concentração de partículas nos diferentes ensaios.

Dias	Partículas/mL						
	T	0,5 NH ₄	1 NH ₄	2,5 NH ₄	0,5 NO ₃	1 NO ₃	2,5 NO ₃
0	7075	7958	6673	8840	8280	8953	10710
1	5673	6133	6075	8400	8103	6510	8908
2	6548	7743	8383	9930	11065	9790	10350
3	9325	11200	12145	15035	14615	13103	17010
7	15270	23148	23335	25058	15210	15583	20048
8	14213	26940	29960	39488	20348	26010	29955
9	15370	30030	35068	45785	19415	25655	29715
10	16968	29180	33663	44615	-	-	-
Max. de partículas (Dia)	10	9	9	9	8	8	8

Nos ensaios a que foi adicionado azoto, pode-se verificar que a densidade celular mais elevada ocorreu ao 9º dia para a adição de N-Amoniacal e ao 8º dia para a adição de N-Nitratos, após o que a população tendeu a decair.

Para uma melhor visualização do comportamento das culturas, apresentam-se, no Anexo III, os gráficos de crescimento da população ao longo dos ensaios.

Crescimento das Culturas

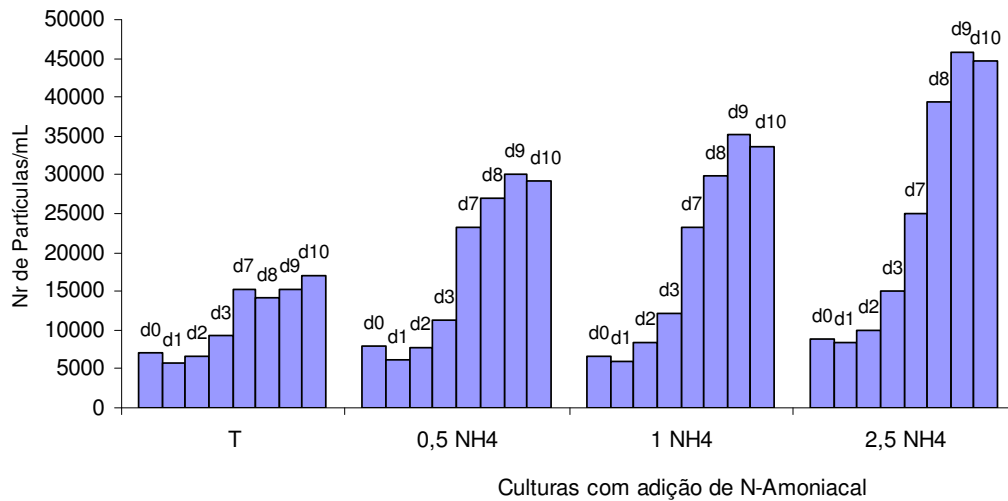


Figura 9 – Concentração de partículas (part./mL) nas culturas com adição de azoto amoniacal

Crescimento das Culturas

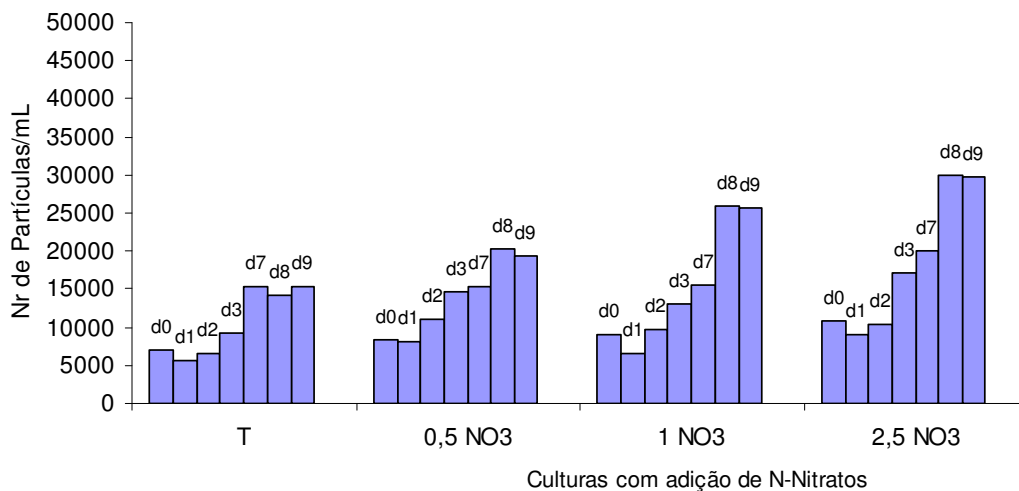


Figura 10 - Concentração de partículas (part./mL) nas culturas com adição de nitratos

Como se pode observar pelas figuras 9 e 10, os ensaios testemunha foram os que apresentaram um comportamento mais instável ao longo dos dez dias de ensaio. Este facto pode estar relacionado com a indisponibilidade de azoto no meio de cultura.

A cultura nos ensaios testemunha cresceu até ao sétimo dia, diminui e voltou a aumentar de seguida. Este facto pode indicar ter havido lise celular, com consequente libertação para o meio do seu material celular (Oudra *et al.*, 2001). O aumento que se seguiu terá sido consequência da reciclagem de nutrientes no meio.

O crescimento ainda que ligeiro da cultura dos ensaios testemunha pode ser explicado pela existência de reservas internas de azoto nas células que possibilitaram a manutenção da cultura. De acordo com o modelo comportamental de Droop (Hesse e Kohl, 2001 citando Kohl e Nicklish, 1988) o crescimento é função da reserva de nutrientes e caracteriza-se por dois processos independentes. Primeiro a rápida assimilação de nutrientes, através de eficientes sistemas de transporte, e depois a conversão interna destes nutrientes em biomassa. Admitindo por isso que o crescimento da cultura está mais dependente da concentração de nutrientes no interior das células ou colónias do que no meio circundante.

Este crescimento pode ainda ser justificado pela presença de espécies fixadoras de azoto atmosférico, já que se tratava de culturas mistas. Em Schindler (1978) é referido um estudo detalhado sobre a necessidade de nutrientes, em que a fixação de N atmosférico (Schindler 1976, 1977) surge como um processo que permite o desenvolvimento de fitoplankton em lagos onde o quociente N:P é reduzido, da ordem dos 5:1. No lago Chaohu, na China, em períodos em que as concentrações de nitrato – NO_3 e amónia – NH_4 diminuem, como é o caso da Primavera, aumenta o desenvolvimento das espécies fixadoras de azoto, como *Anabaena*, até que se atinja um máximo no Verão (Deng *et al.*, 2007).

De uma forma geral, todos os outros ensaios se comportaram de forma semelhante. Existiu uma nítida fase inicial de adaptação ao meio, em que o número de indivíduos tendeu a diminuir entre o dia em que as culturas foram inoculadas - dia zero, e o dia um do ensaio. Seguiu-se uma fase de crescimento generalizada até ao dia oito nas culturas com adição de nitratos (Figura 10) e ao dia nove nas culturas com azoto na forma amoniacal (Figura 9).

Pode-se perceber pelas figuras que o aumento do número de partículas, isto é o crescimento dos efectivos da população, foi mais significativo para os meios com disponibilidades de azoto amoniacal. O azoto nesta forma é directamente assimilado, enquanto os nitratos têm de ser previamente reduzidos para serem consumidos pelas cianobactérias.

Segundo Dias, 2000 (citando Wetzel, 1993) os estados menos oxidados requerem menos energia de assimilação, isto é, a energia para assimilar a amónia é mais baixa aumentando

para os nitratos, daí que se compreenda esta discrepância nos valores máximos atingidos para as partículas em suspensão.

4.2. Clorofila-a e feopigmentos

Os resultados obtidos para as concentrações de clorofila-a obtidas no final de cada ensaio são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 – Teores de Clorofila-a e Feopigmentos

	Sem adição de azoto			
Amostra	Inicial		T	
Cl-a (mg/m³)	0,5		9,7	
Feopigmentos (mg/m³)	2,5		26,7	
Razão cl-a/feo	0,2		0,4	
	Com adição de azoto amoniacal			
Amostra	0,5 NH4		1 NH4	2,5 NH4
Cl-a (mg/m³)	36,6		61,8	105,7
Feopigmentos (mg/m³)	108,3		171,6	251,3
Razão cl-a/feo	0,3		0,4	0,4
	Com adição de nitratos			
Amostra	0,5 NO3		1 NO3	2,5 NO3
Cl-a (mg/m³)	14,2		21,0	46,2
Feopigmentos (mg/m³)	37,3		63,6	135,2
Razão cl-a/feo	0,4		0,3	0,3

Condições Finais de Pigmentos

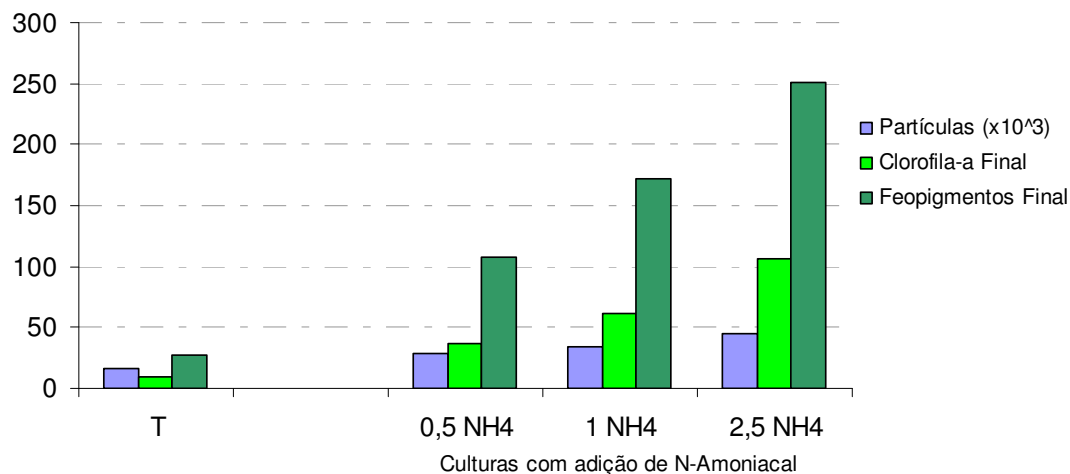


Figura 11 - Comparação da densidade celular no último dia (part./mL) com as concentrações dos pigmentos (mg/m³) – Culturas com adição de azoto amoniacal

Condições Finais de Pigmentos

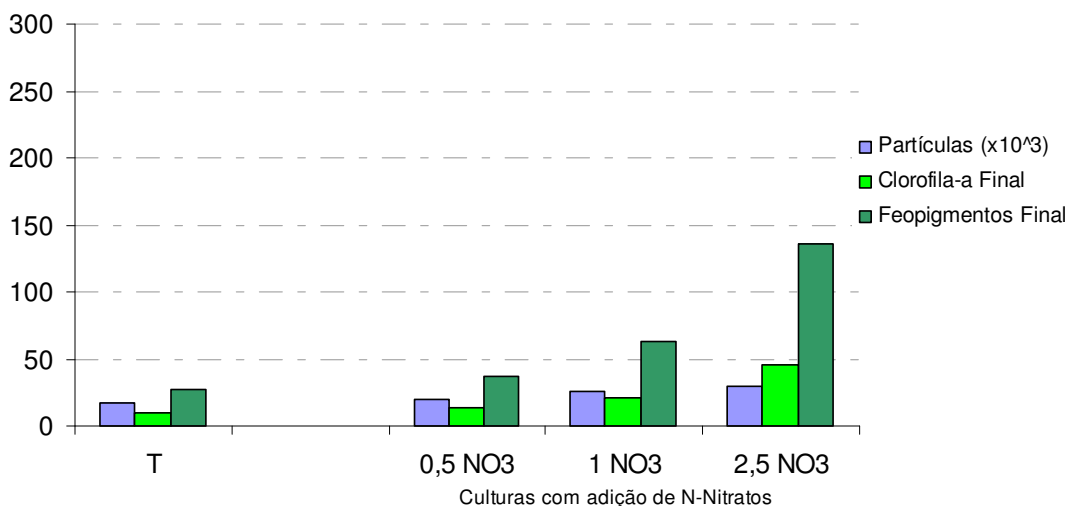


Figura 12 - Comparação da densidade celular no último dia (part./mL) com as concentrações dos pigmentos (mg/m³) – Culturas com adição de nitratos

Como se pode verificar, tanto na adição de azoto amoniacal (Figura 11) como na de nitratos (Figura 12) quanto maior a dose de azoto adicionada, maior a concentração de pigmentos obtida no final dos ensaios. Importa ainda referir que tanto no caso da clorofila-a como no dos feopigmentos, os valores encontrados foram claramente superiores nas culturas em que

se adicionou azoto na forma amoniacal, relativamente àqueles em que a forma de azoto utilizada foi a de nitrato.

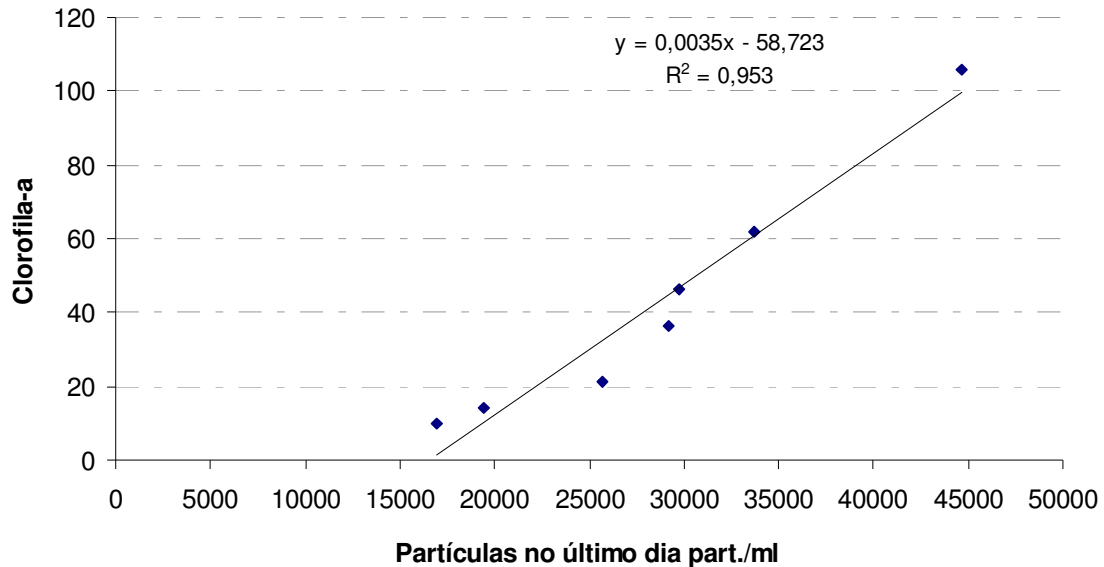


Figura 13 – Correlação entre a concentração (part./mL) de partículas em suspensão e a concentração de clorofila-a (mg/m^3) registadas no final das culturas

Na Figura 13, pode-se observar que a concentração dos pigmentos está linearmente relacionada com a quantidade de partículas em suspensão. Pode por isso admitir-se que uma maior disponibilidade de nutrientes favorece o crescimento dos organismos e conseqüentemente a concentração de pigmentos fotossintéticos ou a alteração da relação quantitativa entre os vários grupos fitoplanctónicos presentes.

De acordo com a OCDE (Santos *et al.*, 2005) os valores de clorofila-a definidos para meios eutróficos são de 25 a $75\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para meios hipertróficos maiores de $75\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pelo que de acordo com os ensaios aqui apresentados pode-se admitir que meios que apresentem mais de 0,5mg de N/l na forma amoniacal são meios passíveis de sofrer eutrofização. Já para os meios em que a disponibilidade de azoto surge na forma de nitratos, é necessária uma concentração de azoto superior a 1mg/l para que o mesmo efeito se verifique

Sabendo que a razão Clorofila-a/Feopigmentos permite ter uma ideia da idade da cultura, estimando o seu envelhecimento, apresentam-se também os resultados daquela relação para o ensaio realizado (Quadro 6), tendo em conta que quanto mais velha é uma população menor deverá ser o teor de clorofila-a presentes e maior o valor de feopigmentos. Como se pode verificar os organismos utilizados como inóculo já estavam envelhecidos, o que em parte explica a dificuldade de adaptação ao novo meio e conseqüente diminuição de efectivos referida já anteriormente.

De acordo com Oliver e Ganf (2000) considera-se a presença de um *bloom* para concentrações de clorofila-*a* superiores a 10µg/L ou 20*10⁶células/L de organismos fitoplanctónicos. Ainda que pelas concentrações de partículas em suspensão estejamos muito longe deste valor, no que toca às concentrações de clorofila-*a*, todas as amostras à excepção da testemunha, excederam o valor referido.

No Quadro 7 são apresentadas as relações entre a concentração de clorofila-*a* e a de partículas no último dia do ensaio.

Quadro 7 – Concentração de Clorofila –a por unidade de biomassa				
		Culturas com adição de N-Amoniacal		
Amostra	T	0,5mg/L	1mg/L	2,5 mg/L
Nr de partículas no último dia (part./mL)	16968	29180	33663	44615
Cl-a (µg/mL)	0,0097	0,0366	0,0618	0,1057
Cl-a/P (µg.part⁻¹)	5,71664E-07	1,25E-06	1,84E-06	2,37E-06

		Culturas com adição de N-Nitratos		
Amostra		0,5mg/L	1mg/L	2,5 mg/L
Nr de partículas no último dia (part./mL)		19415	25655	29715
Cl-a (µg/mL)		0,0142	0,021	0,0462
Cl-a/P (µg.part⁻¹)		7,31E-07	8,19E-07	1,55E-06

Pode-se observar que a produção unitária de clorofila-*a* aumenta com a dose de azoto adicionada o que leva a crer que doses crescentes de azoto influenciam positivamente a produção de pigmentos. É ainda visível que a produção de clorofila-*a* é maior nas culturas com adição de azoto na forma amoniacal.

4.3. Formas de fósforo

As condições iniciais no que toca às formas de fósforo disponíveis eram iguais para todos os meios de cultura.

Nas figuras 14 e 15 são apresentadas, a relação entre as concentrações máximas de partículas atingidas nos ensaios, e as das várias formas de fósforo, para as diferentes formas de azoto inicialmente disponíveis nos meios de cultura.

Condições Finais de Fósforo

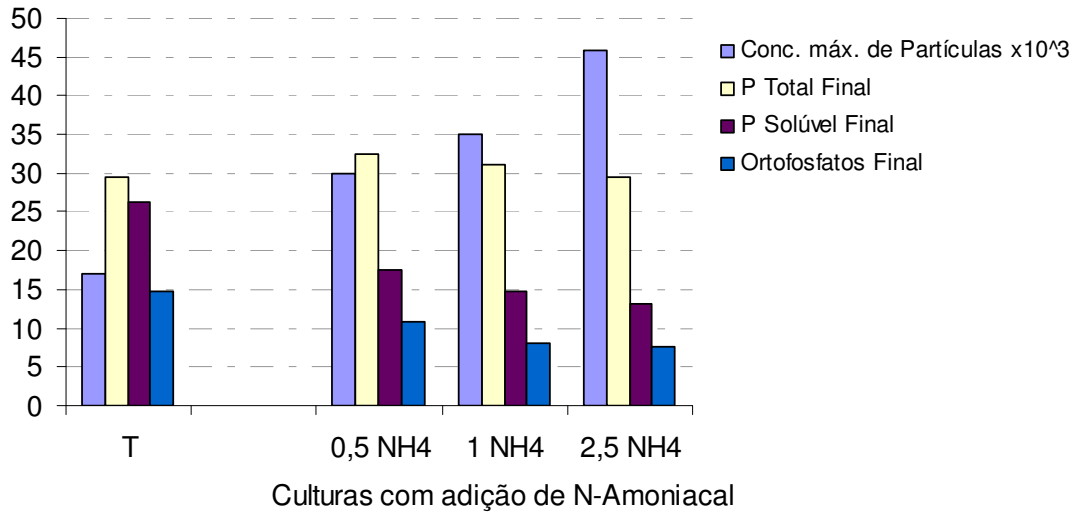


Figura 14 – Comparação da densidade celular máxima (part./mL) com as concentrações das formas de fósforo ($\mu\text{g/L}$) disponíveis no final dos ensaios com adição de azoto amoniacal

Condições Finais de Fósforo

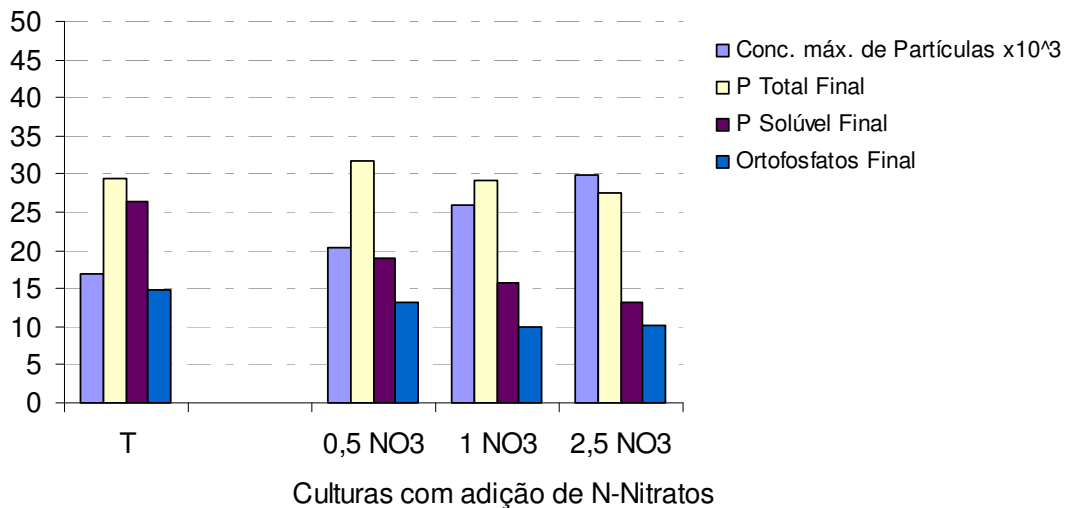


Figura 15 - Comparação da densidade celular máxima (part./mL) com as concentrações das formas de fósforo ($\mu\text{g/L}$) disponíveis no final dos ensaios com adição nitratos

Pela análise das figuras podemos verificar existir uma relação entre as concentrações finais das diferentes formas de fósforo presente e o aumento das partículas em suspensão.

Quanto maior a concentração de partículas menor a concentração final de fósforo solúvel e ortofosfatos, o que significa que existiu um consumo maior deste nutriente.

Remoção Percentual de Fósforo Solúvel

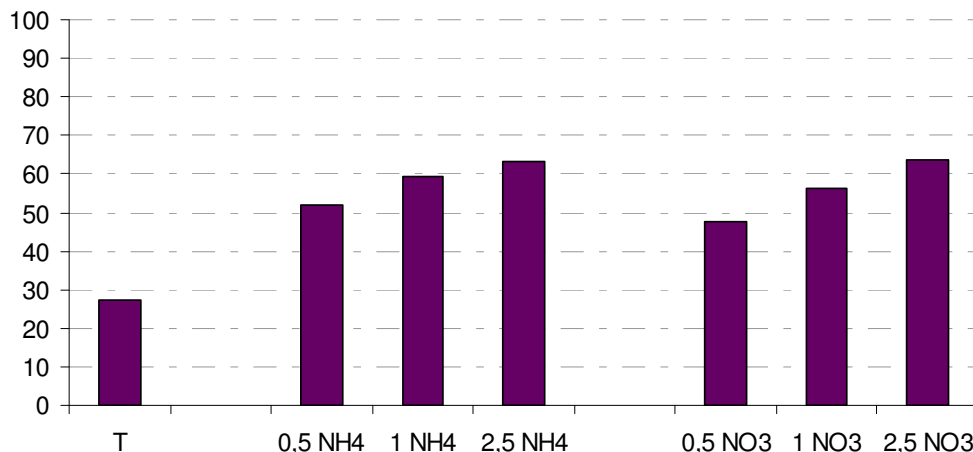


Figura 16 – Remoção percentual (%) de fósforo solúvel nas culturas com adição de azoto na forma amoniacal e de nitratos

Remoção Percentual de Ortofosfatos

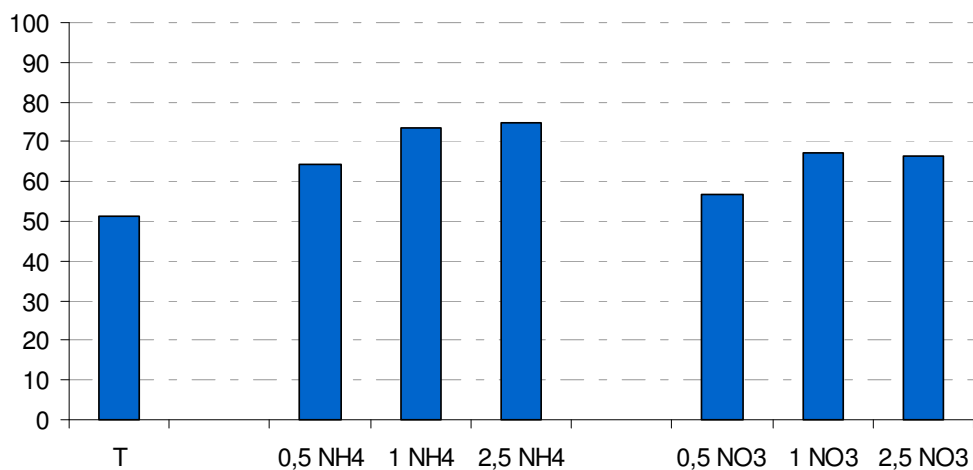


Figura 17 – Remoção percentual (%) de ortofosfatos nas culturas com adição de azoto na forma amoniacal e de nitratos

As figuras 16 e 17 permitem identificar uma relação entre as adições crescentes de azoto e os consumos de fósforo registados, facto que confirma que quanto maior a disponibilidade de azoto no meio, maior é o consumo do fósforo.

Em termos percentuais não se verifica uma grande diferença entre o fósforo solúvel e os ortofosfatos consumidos nas culturas com adição de azoto amoniacal face àquelas em que foi adicionado nitratos. Pode-se verificar que os consumos nas culturas com nitratos são ligeiramente mais baixos, o que se deve ter ficado a dever ao facto das densidades populacionais terem sido menores.

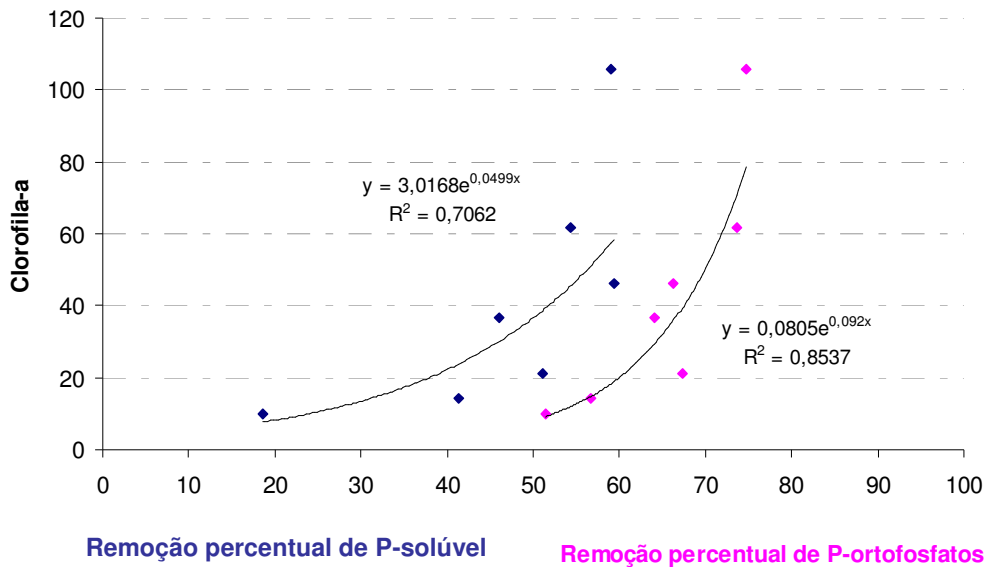


Figura 18 - Correlação entre a remoção de P solúvel e Ortofosfatos (%) e a concentração de clorofila-a (mg/m³) registada no final das culturas

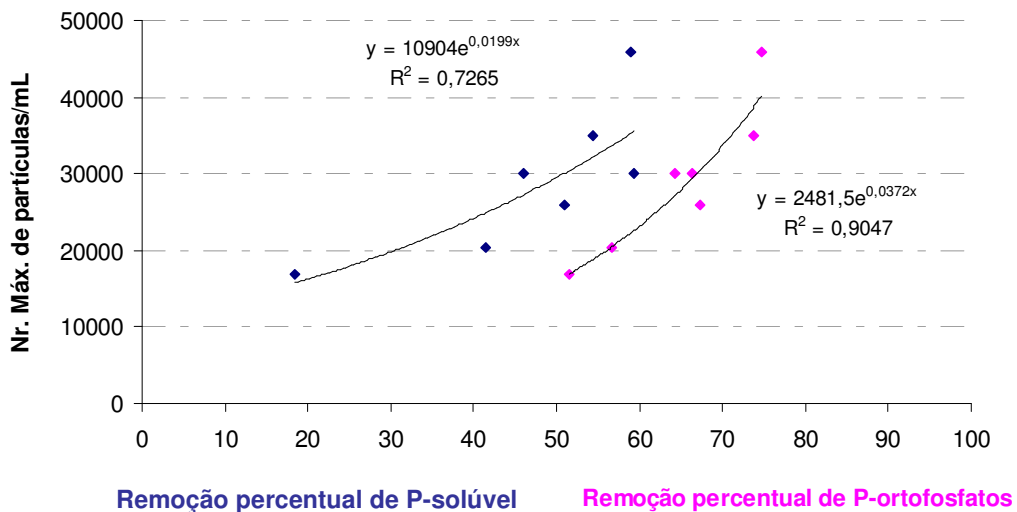


Figura 19 - Correlação entre a remoção de P solúvel e Ortofosfatos (%) e a concentração máxima de partículas (part./mL) em suspensão

As figuras 18 e 19 apresentam a relação exponencial entre a remoção de formas de fósforo e as concentrações de clorofila-a e partículas em suspensão. Esta relação é no entanto

ligeiramente mais significativa para a remoção de fósforo na forma de ortofosfatos que na forma de fósforo total solúvel.

Os coeficientes de correlação não são no entanto tão elevados quanto o esperado, muito provavelmente por ter existido um consumo de luxo de P, isto é, um consumo por parte dos organismos, muito além do que as suas necessidades exigiriam.

De um modo geral pode-se concluir que todas as formas de fósforo são consumidas ao longo do tempo dos ensaios, ainda que o fósforo total deva sofrer reciclagem nos meios de cultura. A tendência é para que as concentrações de fósforo particulado aumentem com a evolução das populações. Ainda assim, do que se verifica nas figuras 20 e A.9 do Anexo IV, esta relação não parece muito consistente, muito provavelmente devido ao consumo de luxo já referido. Ainda que o fósforo seja incorporado nas células dos organismos, não é totalmente metabolizado no desenvolvimento de biomassa.

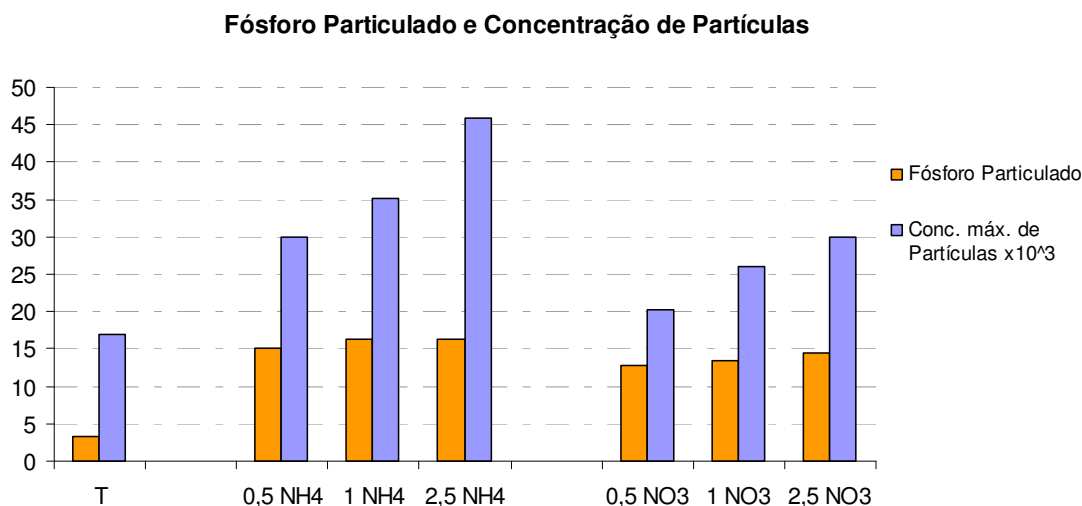


Figura 20 - Relação entre a concentração máxima de partículas (part./mL) e o fósforo na forma particulada (µg/L)

Kozlowsky-suzuki *et al.* (2002) referiu que os teores de clorofila-*a* mostram uma relação positiva com as concentrações de ortofosfatos, fósforo solúvel e fósforo total, suportando a teoria da limitação de P. Esta correlação entre a clorofila-*a* e o fósforo particulado reflecte a incorporação de P nas células de fitoplâncton, uma vez que os organismos tendem a absorver e incorporar nas suas células elevadas quantidades do nutriente limitante (Urabe *et al.*, 1995). Esta relação não se verifica para o ensaio realizado. Tendo em conta que a quantidade de fósforo introduzida no meio era igual para todas as culturas, seria de esperar que segundo a teoria, a produção de clorofila-*a* fosse semelhante para todos os ensaios.

Tomando em consideração que o fósforo particulado corresponde à diferença entre o valor do fósforo total e do fósforo solúvel, apenas se pode ver pela Figura 21 que quanto maior a concentração de fósforo particulado maior a concentração de clorofila-a. Não se observa ainda assim (Anexo IV, Figura A. 8) uma relação entre a incorporação celular e o aumento da concentração deste pigmento.

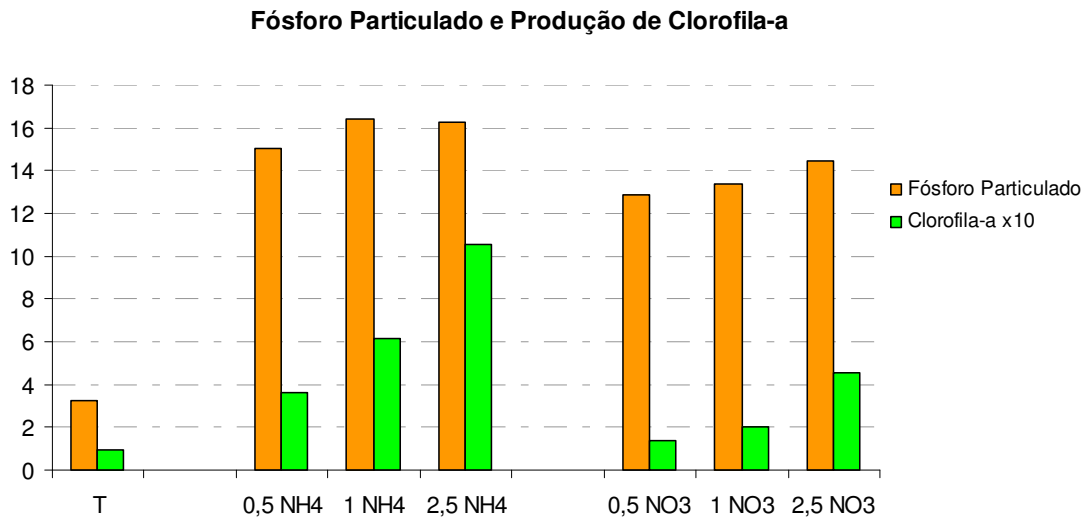


Figura 21 - Comparação dos teores de clorofila-a produzida (mg/m^3) com o fósforo ($\mu\text{g}/\text{L}$) particulado

4.4. Formas de azoto

Para apresentar os resultados obtidos no final dos ensaios optou-se pela representação gráfica dos consumos percentuais de azoto nas diferentes culturas (figuras 22 e 23).

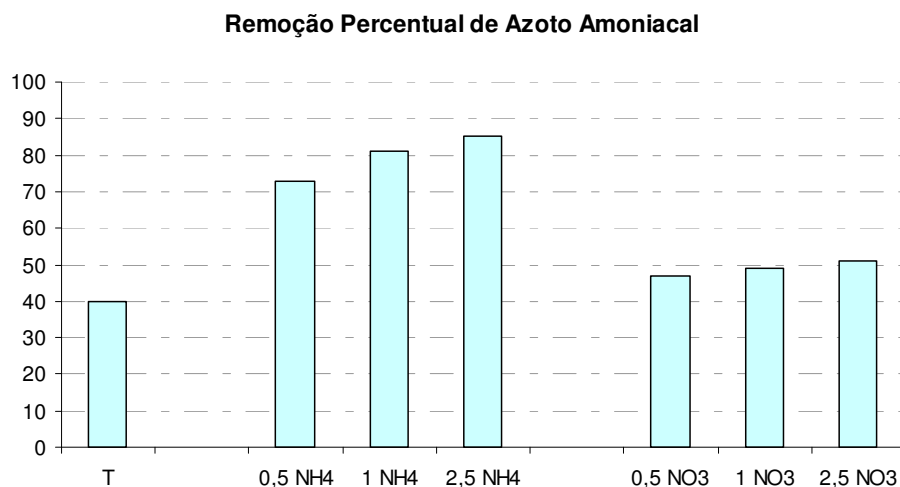


Figura 22 – Remoção percentual (%) de azoto amoniacal

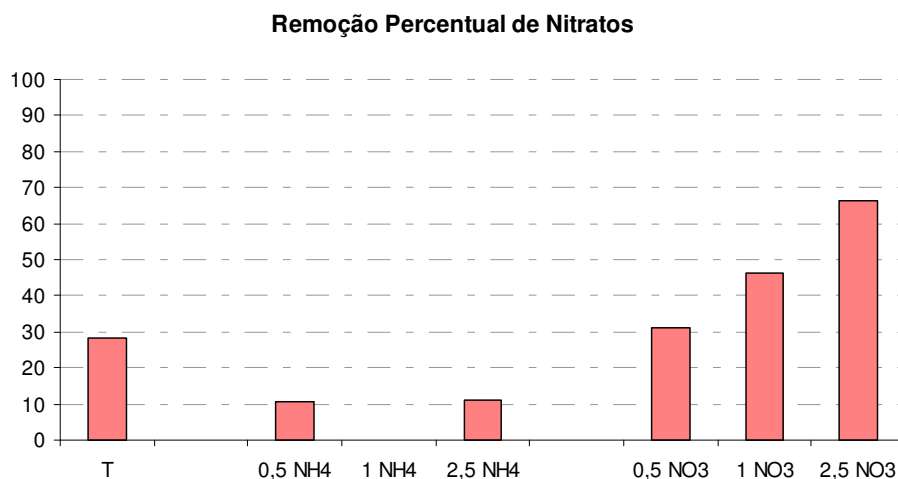


Figura 23 – Remoção percentual (%) de nitratos

Nas figuras 22 e 23 é visível que o consumo percentual de azoto amoniacal foi maior nos meios em que esta foi a forma de azoto adicionada à composição do meio. Já nas culturas em que o azoto foi adicionado na forma de nitratos, foi esta forma que apresentou maior percentagem de remoção. Este facto parece indicar que as populações que dominam as culturas com adições de diferentes formas de azoto são também diferentes.

A remoção calculada de nitratos na cultura com adição de 1mg/L de azoto amoniacal foi negativa, uma vez que a concentração de nitratos nessa cultura aumentou cerca de 8%, pelo que na Figura 23 se optou pela não representação. Admitiu-se que esta situação tenha ocorrido por nitrificação de azoto, já que é possível ter existido contaminação do meio por bactérias nitrificantes.

Pode ainda verificar-se que a remoção de azoto amoniacal nos ensaios com adição de nitratos ao meio de cultura foi de aproximadamente 50% do inicialmente presente. Por outro lado, nas culturas em que a adição de azoto foi feito na forma amoniacal, a remoção de nitratos foi apenas de 10%. Este baixo consumo é justificado pela presença de azoto amoniacal disponível. Se existe uma forma de azoto mais facilmente assimilável no meio, os organismos não vão utilizar formas que impliquem um maior investimento energético.

As figuras 24 e 25 representam as relações entre a remoção de nitratos e azoto amoniacal (nas culturas com adição de nitratos e azoto amoniacal respectivamente) com a concentração de clorofila-*a* e de partículas em suspensão.

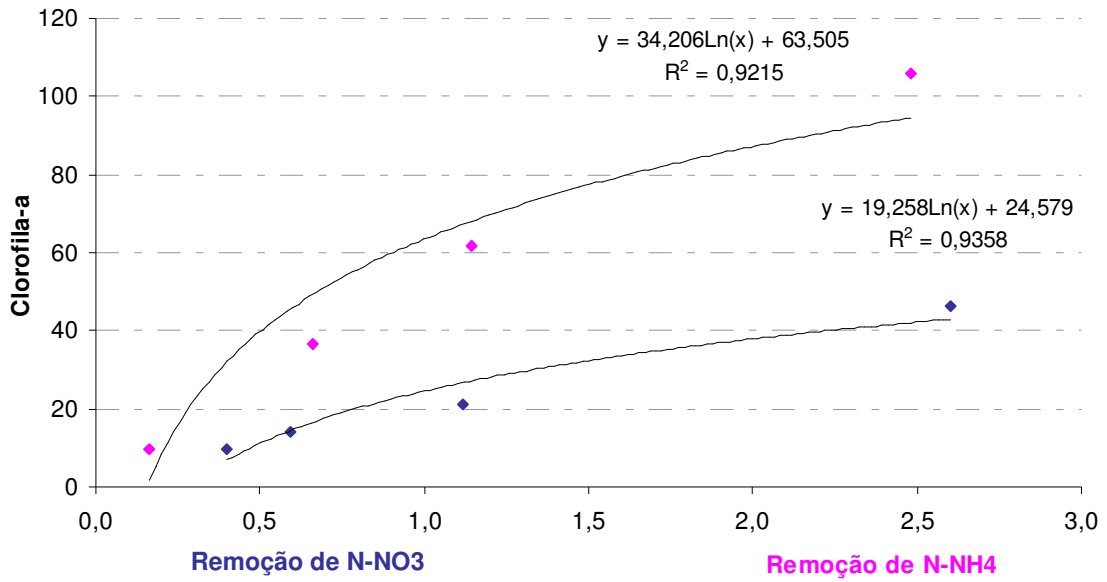


Figura 24 – Relação entre as formas de azoto removidas (mg/L) com a concentração de clorofila-a (mg/m3)

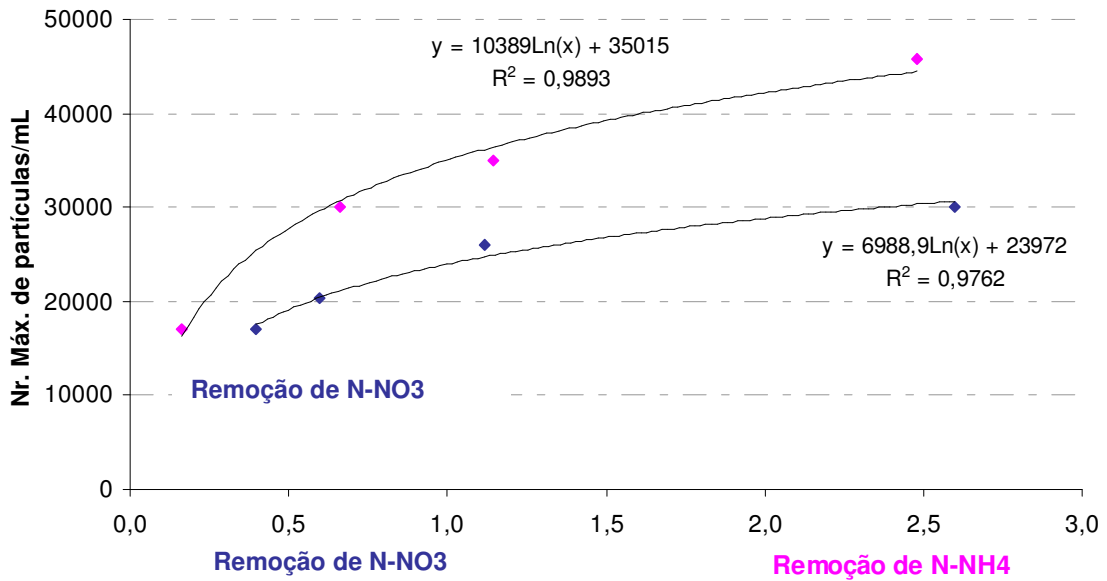


Figura 25 - Relação entre as formas de azoto removidas (mg/L) com a concentração de partículas em suspensão (part./mL)

Pode-se perceber pelas figuras 24 e 25 que, tanto a remoção de azoto amoniacal como a de nitratos nas respectivas culturas, está relacionada com a concentração final de clorofila-a e com a concentração máxima de partículas.

Nem todas as formas de azoto disponível no meio foram consumidas. As concentrações de N-Kjeldahl, isto é a soma do azoto orgânico com o azoto amoniacal, no final revelaram-se tanto maiores quanto maiores as doses de azoto adicionadas. Este facto não surpreende já que é normal que o azoto presente no meio seja convertido em azoto orgânico aquando da incorporação no material celular.

O azoto orgânico produzido está representado na Figura 26.

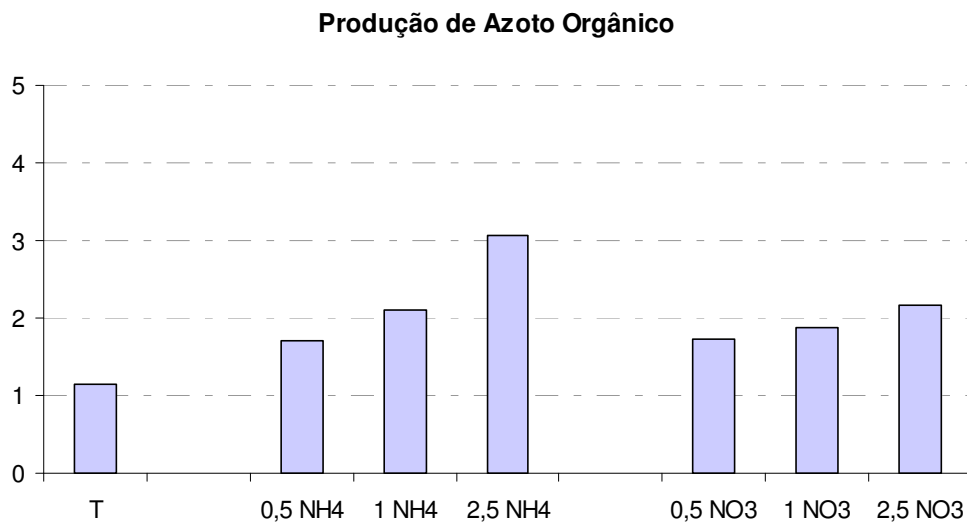


Figura 26 – Produção de azoto orgânico (mg/L)

A produção de azoto orgânico está claramente associada ao crescimento de partículas em suspensão. Assim como as populações cresceram mais nos meios com adição de N-amoniacal, também os teores de azoto orgânicos foram mais elevados para essas culturas.

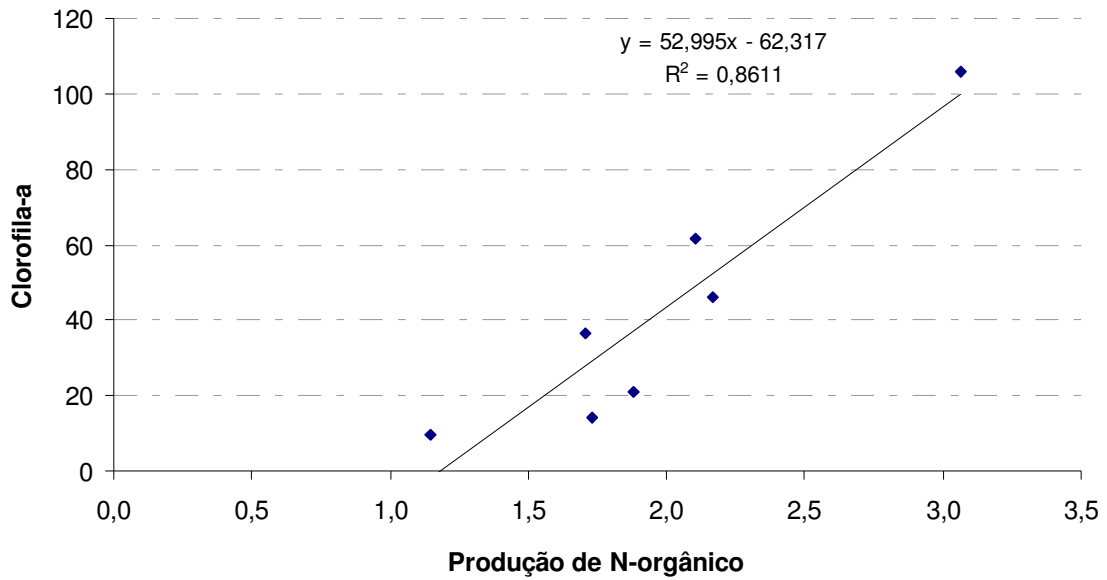


Figura 27 - Correlação entre azoto orgânico produzido (mg/L) e a concentração de clorofila-a (mg/m³) registada no final das culturas

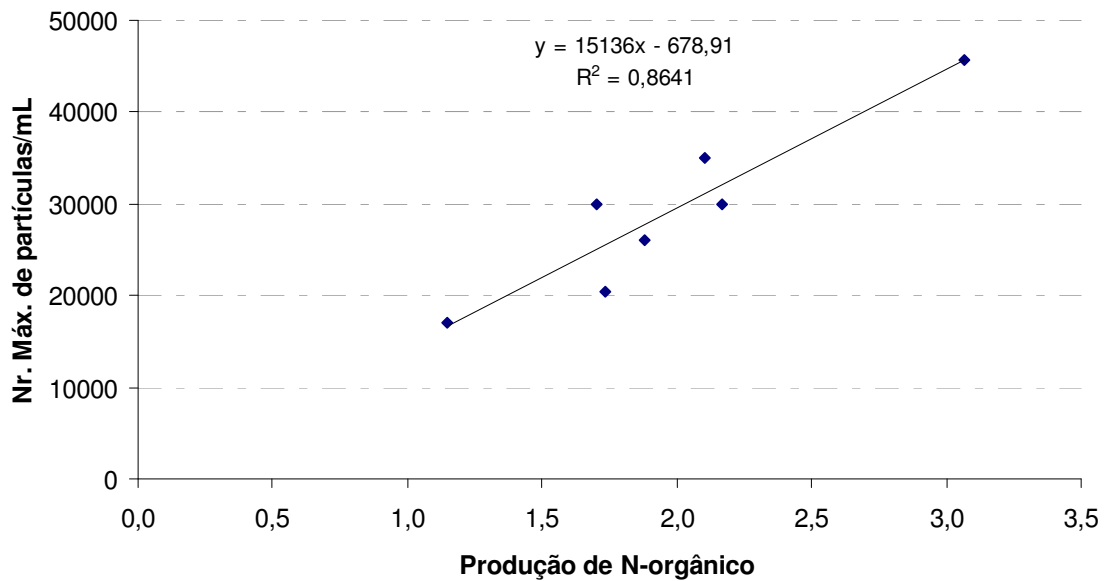


Figura 28 - Correlação entre azoto orgânico produzido (mg/L) e a concentração máxima de partículas (part./mL) registada

Nas figuras 27 e 28 é visível que existem relações lineares entre o azoto orgânico produzido e as concentrações máximas de partículas em suspensão e de clorofila-a registada no último dia das culturas.

5. Conclusões

De uma forma geral, conclui-se que as culturas aumentaram o número de efectivos ao longo do tempo de duração do ensaio, e que o aumento da população foi bem mais significativa nos meios em que as disponibilidades de azoto amoniacal eram maiores. Este facto deve-se à facilidade com que este composto é assimilado pelos organismos, implicando um menor dispêndio de energia.

Obernosterer e Herndl (1995) apresentam como relação ideal para fitoplancton o rácio de Redfield (1963) 16N:P, o que significa que para os 30 μ g de P adicionados às culturas seriam necessários 0,5mg de N. Assim, conclui-se que nos ensaios com adição de 1mg e 2,5mg de N/L, seja na forma de amoniacal seja na de nitratos, o azoto está em excesso, o que é mais comum em condições naturais. Ainda que os meios utilizados simulassem, na sua maioria, condições de excesso de azoto, as populações não atingiram valores que demonstrassem a limitação normalmente imposta pelo fósforo, já que todas as culturas cresceram mais quanto maior a dose de azoto adicionada.

Pode-se também concluir que as doses de azoto adicionadas influenciaram positivamente a produção de pigmentos. A concentração destes aumentou ao longo dos ensaios, também em consequência do aumento da densidade celular. Nota-se ainda que se o azoto estivesse na forma de N-amoniacal, o aumento era bem mais significativo. Esta relação entre a concentração de partículas em suspensão e a concentração de clorofila-a foi aproximada à linear com um R^2 de 0,95 ($p < 0,01$).

Quanto maior a concentração de feopigmentos face à de clorofilas, mais envelhecida é a cultura. Esta relação deve ser tida em conta na população inicial, já que quanto mais degradados os organismos que vão servir de inóculo, mais difícil será o arranque do desenvolvimento nos recipientes de cultura. É ainda importante considerar que quanto maior a idade da cultura maior a possibilidade de que sejam libertados compostos tóxicos.

A remoção de fósforo solúvel e ortofosfatos acompanhou o aumento das concentrações de partículas e de clorofila-a presente no meio. Estes parâmetros apresentaram uma correlação que pode ser aproximada da exponencial, sendo que R^2 foi de aproximadamente 0,73 ($p < 0,05$) e 0,71 ($p < 0,05$) na remoção de P solúvel e de 0,90 ($p < 0,01$) e 0,85 ($p < 0,01$) na de ortofosfatos. Os coeficientes de correlação baixos estão relacionados com o consumo de luxo de fósforo, levada a cabo pelos organismos, indicando assim que nem todo o fósforo assimilado é utilizado na produção de biomassa.

No que toca à remoção de azoto, o consumo na forma amoniacal foi sempre significativo, mesmo em situações de adição de nitratos.

Pode-se ainda concluir que a remoção de azoto em ambas as formas apresentou uma relação com a clorofila-a existente nas culturas. Estas correlações apresentaram um R^2 de

0,98 ($p < 0,05$) para a remoção de azoto amoniacal em culturas com adição de azoto nesta forma e 0,94 ($p < 0,05$) para a remoção de nitratos nas culturas com adição destes. Estas correlações mostram uma dependência do azoto na produção de pigmentos como é referido na bibliografia.

Já a remoção de formas de azoto e a concentração máxima de partículas apresentou uma correlação aproximada à função logarítmica, com um R^2 de 0,99 ($p < 0,01$) para a remoção de azoto amoniacal e de 0,98 ($p < 0,05$) para a remoção de nitratos.

Pode-se concluir também que à medida que os organismos se desenvolveram, o azoto orgânico aumentou, já que foi incorporado o azoto inorgânico na biomassa celular. Tanto as concentrações de clorofila-*a* como as de partículas em suspensão estão linearmente relacionadas com a produção de azoto orgânico, apresentando ambas um R^2 de aproximadamente 0,86 ($p < 0,01$).

Admite-se que a variabilidade de uma variável pode ser explicada a partir das variações de outra, ainda que as correlações observadas não sejam muito fortes do ponto de vista matemático. No entanto, e por se tratar de um ensaio experimental com organismos vivos, estes resultados foram considerados aceitáveis. As correlações apresentam uma significância estatística entre os 95% e 99%, pelo que são consideradas válidas.

Há que ter em conta que este género de ensaios implica alguma imprevisibilidade, por se tratarem de organismos vivos em cultura mista. Este facto dificulta por si só a repetibilidade dos resultados.

Recomenda-se a realização de uma segunda fase de ensaios, em que as concentrações de azoto sejam fixas. Nesta, aos meios de cultura devem ser adicionados diferentes teores de fósforo, de forma a permitir complementar os resultados aqui apresentados.

6. Referências Bibliográficas

AMARAL, A.F.S., RODRIGUES, A.S., 2007. *Chronic exposure to volcanic environments and chronic bronchitis incidence in the Azores, Portugal*. Environmental Research Volume 103, Issue 3, March 2007, p. 419-423.

APHA/AWWA/WEF, 1998. *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*, 1998, 20th. Ed. APHA, Washington, USA

BARTRAM, J., 1998. *Guías para ambientes seguros en aguas recreativas Vol. 1: Aguas costeras y aguas dulces, Versión preliminar para consulta*. Organización Mundial de la Salud. Water, Sanitation and Health Unit. CRID - Centro Regional sobre Desastres América Latina y El Caribe, Recursos de informacion sobre agua y desastres - Department of the Protection of the Human Environment

BERNER, E.K., BERNER, R.A., 1987. *The global water cycle, Geochemistry and Enviroment*. Prentice-Hall Inc., New Jersey.

BOAVIDA, M.J.L., 2001. *Problemas de qualidade da água: Eutrofização e poluição*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; Departamento de Zoologia e Centro de Biologia Ambiental.

BRYLINSKY, M., MANN, K.H., 1973. *An analysis of factors governing productivity in lakes and reservoirs*. Limnol. Oceanogr., 18, p. 1–14.

CASTEL, J., CAUMETTE, P., HERBERT, R., 1996. *Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Étang du Prévost*. Hydrobiologia, 329, 19-28.

CCDR / LVT - Comissão de e Desenvolvimento Regional de Lisboa e Vale do Tejo, 2006. *Estudo Sobre a Aplicabilidade do Índice do Estado Trófico de Carlson (1977) na região de Lisboa e Vale do Tejo*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

CODD, G.A., BELL, S.G., KAYA, K., WARD, C.J., BEATTIE, K.A., METCALF, J.S., 1999. *Cyanobacteria toxins, exposure routes and human health*. Eur J Phycol 34, p. 405–415.

CHORUS, I., BARTRAM, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon: London and New York.

CRUZ, J.V., ANTUNES, P., AMARAL, C., FRANCA, Z., NUNES, J.C., 2006. *Volcanic lakes of the Azores archipelago (Portugal): Geological setting and geochemical characterization*. Journal of volcanology and geothermal research. 156, iss: 1-2 pg:135 -157.

- DENG, D.G., XIE, P., ZHOU, Q., YANG, H., GUO, L.G., 2007. *Studies on temporal and spatial variations of phytoplankton in Lake Chaohu*. Journal of Integrative Plant Biology 49 (4): 409-418.
- DIAS, A.M.S., 2000. *Estudo da dinâmica espacial e temporal dos principais factores abióticos e da comunidade fitoplanctónica da Vala da Maceda*. Tese de Mestrado – Orientador N. Formigo. Faculdade de ciências da universidade do Porto; Departamento de zoologia e antropologia.
- DITTMANN, E., WIEGAND, C., 2006. *Cyanobacterial toxins—occurrence, biosynthesis and impact on human affairs*. Mol Nutr Food Res;50:717.
- DUARTE, E., 2000. *Caracterização da comunidade de macro-invertebrados bentónicos da Vala de Maceda e seus afluentes*. Tese de Mestrado – Orientador N. Formigo. Faculdade de ciências da universidade do Porto; Departamento de zoologia e antropologia.
- FARIA, B.M., 1993. *Metabolismo e crises distróficas na laguna da Barra, Maricá, RJ*. Masters Thesis, UFF, RJ, p. 86.
- FERNALD, S.H., CARACO, N.F., COLE, J.J., 2007. *Changes in cyanobacterial dominance following the invasion of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: Long-term results from the Hudson River Estuary*. Estuaries and Coasts 30 (1): 163-170
- FULTON, R.S., PAERL, H.W., 1987. *Effects of colonial morphology on zooplankton utilisation of algal resources during blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) blooms*. Limnol Oceanogr 32, p. 634–644.
- GOWEN, R.J., TETT, P., JONES, K.J., 1992. *Predicting marine eutrophication: the yield of chlorophyll from nitrogen in Scottish coastal phytoplankton*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 85, 153–161.
- GUEST, J.E., GASPAR, J.L., COLE, P.D., QUEIROZ, G., DUNCAN, A.M., WALLENSTEIN, N.T., FERREIRA, J., PACHECO, M., 1999. *Volcanic geology of Furnas Volcano, São Miguel, Azores*. Journal of Volcanology and Geothermal Research Volume 92, Issues 1-2, September 1999, p 1-29.
- HESSE, K., KOHL, J.-G., 2001. *Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa**. Ingrid Chorus (ed.), Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. Springer-Verlag KG. p. 152-158.
- ISTVANOVICS, V., PETTERSSON, K., RODRIGO, M., PIERSON, D., PADISAK, J., AND COLOM, W., 1993. *Gloetrichia-Echinulata, a Colonial Cyanobacterium with a Unique Phosphorus Uptake and Life Strategy*. Journal of Plankton Research, 15(5): 531- 552.

- JEPPESEN, E., SØNDERGAARD, M., KRONVANG, B., JENSEN, J. P., SVENDSEN, L. M., LAURIDSEN, T. L., 1999. *Lake and catchment management in Denmark*. Hydrobiologia 395/396: 419–432.
- KAJAK, Z., HILLBRICH-ILKOWSKA, A., 1972. Productivity problems of freshwaters. Proceedings, IBP-UNESCO Symposium, Kazimierz-Dolny, May 1970. Polish Scientific Publishers.
- KJERFVE, B., 1994. *Coastal lagoon processes*. Elsevier Science, Amsterdam. p. 1-8.
- KOBAYASHI, H., ARAO, K., MURAYAMA, T., IOKIBE, K., KOGA, R., SHIOBARA, M., 2007. *High-Resolution Measurement of Size Distributions of Asian Dust Using a Coulter Multisizer*. Journal of Atmospheric and Oceanic Technology, 24, p. 194–205.
- KOZLOWSKY-SUZUKI, B., BOZELLI, R.L., 2002, Experimental evidence of the effect of nutrient enrichment on the zooplankton in a brazilian coastal lagoon. Brazilian Journal of Biology. 62, p. 835-846.
- LORENZEN, C.J., 1967. *Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations*. Limnol. Oceanogr., 12, p. 343-346.
- NICHOLSON, B. C., ROSITANO, J. AND BURCH, M. D., 1994. *Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine*. Water Research 28(6), 1297-1303.
- NOGUEIRA, I.C.G., LOBO-DA-CUNHA, A., VASCONCELOS, V.M. , 2006. *Effects of Cylindrospermopsis raciborskii and Aphanizomenon ovalisporum (cyanobacteria) ingestion on Daphnia magna midgut and associated diverticula epithelium*. Elsevier - Aquatic Toxicology 80 194–203.
- OBERNOSTERER, I., HERNDL, G.J., 1995. *Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio*. Marine Ecology Progress Series 116: 247-257.
- OLIVER R. L., GANF G. G., 2000. *Freshwater blooms*. The ecology of cyanobacteria, Whitten B. A., Potts M., eds. (2000) Netherlands: Kluwer Academic Publishers 149-194.
- OSSWALD, J., RELLÁN, S., GAGO, A., VASCONCELOS, V., 2007. *Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a*. Elsevier - Environment International 33 1070–1089.
- LOUDRA, B., LOUDIKI, M., SBIYYAA, B., MARTINS, R., VASCONCELOS, V., NAMIKOSHI, N., 2001. *Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in Microcystis aeruginosa dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco)*. Toxicon - Elsevier Science Ltd, 39(9): 1375-1381

- PACHECO, D.M., CYMBRON, R., CÂMARA, H.G., TAVARES, J.M., BRITO, A.G., SANTOS, C.R., 2002. Medidas de requalificação ambiental da Lagoa da Furnas, S. Miguel, Açores. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, 6º Congresso da água, Painel 20. Resumo p. 52-53
- PAINTING, S.J., DEVLIN, M.J., MALCOLM, S.J., PARKER, E.R., MILLS, D.K., MILLS, C., TETT, P., WITHER, A., BURT, J., JONES, R., WINPENNY, K., 2007. *Assessing the impact of nutrient enrichment in estuaries: Susceptibility to eutrophication*. Marine pollution bulletin. 55, iss. 1-6 p. 74 -90.
- REYNOLDS, E.S., WALSBY, A.E., 1975. *Water blooms*. Biol Rev 50, p. 437–481.
- REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G.H.M., 1978. *Enumeration of natural Microcystis populations*. Br Phycol J 13, p. 269–277.
- REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G., CMIECH, H., LEEDALE, G., 1981. *On the annual cycle of the blue-green alga Microcystis aeruginosa*. Kütz. Philos Trans R Soc Lond B 293, p. 419–477.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J., HERDMAN, M., STANIER, R., 1979. *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. J. Gen. Microbiol. 111: p 1-61.
- ROSA, M.J.; TEIXEIRA, M.R.; COSTA, H.; MESQUITA, E.; MENAIA, J.; LUCAS, H., 2004. Processos de tratamento para remoção de cianobactérias e cianotoxinas da água para consumo humano. 8ª Conferência Nacional de Ambiente, FCT/UNL. Centro Cultural de Belém, Lisboa, 27-29 de Outubro.
- ROSA, M.J., CAMPINAS, M., SOARES, S., CECÍLIO, T., 2007. *Alterações tecnológicas a implementar na linha de tratamento para cumprimento da nova legislação relativa à qualidade de água para consumo humano*. Tecnologia da Água, 49, p. 18-31
- SANTOS, M.C.R., PACHECO, D.M., SANTANA, F., RODRIGUES, A., 2005. *A Eutrofização das Lagoas das Sete-Cidades e Furnas (S. Miguel – Açores) Análise evolutiva entre 1988 e 2002*. Tecnologia da Água, 36, p. 54-65.
- SAQRANE, S., EL GHAZALI, I., OUAHID, Y., EL HASSNI, M., EL HADRAMI, I., BOUARAB, L., CAMPO, F.F., OUDRA, B., VASCONCELOS, V., 2007. *Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant Lemna gibba: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction*. Elsevier - Aquatic Toxicology 83 284–294.
- SCHINDLER, D.W., 1978. *Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters*. Limnol. Oceanogr., 23, p. 478–486.
- SCHINDLER, D.W., 2006. *Recent advances in the understanding and management of eutrophication*. Limnol. Oceanogr., 51, p. 356–363.

- SCHUBERT, L.B., SCHULZE, E., CAVALLI, V., PINHEIRO, R.M., CÓRDOVA, C., PACHECO, M.R., 2003. *Avaliação do perfil hepático de camundongos após a administração oral de extrato de Pscillatoria sp estimulada por sulfato de cobre*. Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto, Blumenau.
- SCHUMACHER, G., SEKOULOV, I., 2002. *Polishing of secondary effluent by an algal biofilm process*. Water Science and Technology; 46(8): 83-90.
- SHAPIRO, J., 1997. *The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes*. Freshw Biol 37:307–323
- SORANNO, P. A., S. L. HUBLER, S. R. CARPENTER, AND R. C. LATHROP., 1996. *Phosphorus loads to surface waters: A simple model to account for spatial pattern of land use*. Ecol. Appl. 6: 865–878.
- STUMM, W., MORGAN, J.J., 1981. *Aquatic Chemistry*. John Wiley and Sons, New York, p. 780.
- TEIXEIRA, M.R., 2001. *Ultrafiltração no Tratamento de Águas para Consumo Humano*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Sanitária da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Julho. Lisboa
- TEIXEIRA, M.R., ROSA, M.J., 2006. *Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration*. Water Res 40(15):2837–46.
- TUNG, S.C., LIN, T.F., LIU, C.L., LAI, S.D., 2004. *The effect of oxidants on 2-MIB concentration with the presence of cyanobacteria*. Water Science and Technology, 49(9): 281-288
- URABE, J., NAKANISH, M. & KAWABATA, K., 1995, *Contribution of metazoan plankton to the cycling of nitrogen and phosphorus in Lake Biwa*. Limnol. Oceanogr., 40(2): 232-241.
- VASCONCELOS, V. M., SIVONEN O, K. , EVANS, W. R. , CARMICHAEL, W. W., NAMIKOSHI, M., 1996. *Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters*. Pergamon - Plh S0043-1354(96)00152-2 Wat. Res. Vol. 30, No. 10, pp. 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 Reserch 32: 249-254.
- VASCONCELOS, V. M., PEREIRA, E., 2001. *Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal)*. Elsevier – Pergamon Wat. Res. Vol. 35, No. 5, pp. 1354±1357.
- VASCONCELOS, V., OLIVEIRA, S., TELES, F.O., 2001. *Impact of a toxic and a non-toxic strain of Microcystis aeruginosa on the crayfish Procambarus clarkia*. Elsevier - Toxicon 39 1461±1470.

YUNES, J.S., SALOMON, P.S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K.A., RAGGETT, S.L., CODD, G.A., 1996. *Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil*. Journal of aquatic ecosystem health 5, p. 223-229.

WHITTON, B.A., POTTS M. [Eds.] 2000. *The Ecology of Cyanobacteria. Their diversity in Time and Space*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 669 pp.

Recursos on-line:

AZEVEDO, S.F.O., 1998. *Toxinas de Cianobactérias: Causas e conseqüências para a Saúde Pública*. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – CCS – UFRJ. On line - Revista Virtual de Medicina Volume 1- Número 3 - Ano I (Jul/Ago/Set de 1998)

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm

AZORESWEB

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.azoresweb.com/clima.html>

BRAGA, M.N., 2004. *Tóxicos de Origen Cianobacteriano – Microcistinas*. ZOE Tecno-Campo.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/ciano/cianobacterias.htm>

GOOGLE EARTH

HARTZOG, K.C. - Kevin C. Hartzog 's WEB site; Nutrient Cycles.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.starsandseas.com/SAS%20Movies/Sweet%20Fresh%20Water.htm>

HOICZYK, E., HANSEL, A., 2000. *Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope*. Journal of Bacteriology, March 2000, N. 5, Vol. 182, p. 1191-1199.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://j.b.asm.org/cgi/content/full/182/5/1191>

MERHAB-LGL at ESF - *Monitoring and Event Response for Harmful Algal Blooms in the Lower Great Lakes at Environmental Science and Forestry* - State University of New York

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.esf.edu/merhab/toxins.asp>

MRACC – Murray Regional Algal Coordinating Committee – *Blue-Green algal bloom management*. NSW - Murray regional Algal Coordinating Committee. 2002 Copyright www.murraybluegreenalgae.com.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.murraybluegreenalgae.com/blue-green-algae.php>

PATOCKAA, J., STREDAB, L., 2002. *Brief review of natural nonprotein neurotoxins*. Applied Science and Analysis, Inc. The ASA Newsletter. Prague, Czech Republic. ISSN 1057-9419.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/Neurotoxins.htm>

RMB - Environmental Laboratories, Inc., Lakes Monitoring Program.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.rmbel.info/Default.aspx>

UFES-DERN – Universidade Federal do Espírito Santo; Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, 2001. Laboratório de Limnologia e Planejamento Ambiental.

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.dern.ufes.br/limnol/main.html>

UNEP - United Nations Environment Programme, Division of Technology, Industry, and Economics, 2001. *Water Quality: The Impact of Eutrophication*. Newsletter and Technical Publications Lakes and Reservoirs vol. 3

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

http://www.unep.or.jp/ietc/publications/short_series/lakereservoirs-3/1.asp

http://www.unep.or.jp/ietc/publications/short_series/lakereservoirs-3/index.asp

UPC, 2002. Unidade De Pesquisa Em Cianobactérias. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG/RS 2002

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://www.cianobacterias.furg.br/maio2002.html>

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2008. "Bactéria" Wikimedia Foundation

Disponível a 22 de Março de 2007 em:

<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Bact%C3%A9ria&oldid=9868044>

Anexo I – Composição do Meio BG 11 (Rippka *et al.*, 1979)**Quadro A. 1 - Composição do Meio BG 11 utilizado**

Componente	Concentração da Solução Stock (g/L)	Volume a utilizar (mL/L)
NaNO ₃	150	0,2
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	2	0,18
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1
Ácido cítrico combinado com citrato férrico de amónio	6	1
EDTA	1	1
Na ₂ CO ₃	20	1
Trace Metal Solution	Quadro A. 2	1

Quadro A. 2 - Composição da solução de metais em concentrações vestigiais

Substância	g/L
H3BO3	2.86 g
MnCl2.4H2O	1.81 g
ZnSO4.7H2O	0.222 g
Na MoO4.5H2O	0.390 g
CuSO4.5H2O	0.079 g
Co(NO3)2.6H2O	0.0494 g

Estas substâncias devem ser dissolvidas em separado, para só depois adicionar à seguinte da lista.

O pH inicial do meio é de aproximadamente 8,5 devendo ser ajustado para 7,5 para depois proceder a autoclavagem.

A adição de solução tampão HEPES é opcional.

Anexo II – Resumo dos ensaios

Quadro A. 3 - Quadro resumo dos ensaios

				Culturas com adição de N-Amoniacal			Culturas com adição de N-Nitratos			
Amostra		Meio inoculado	T	0,5mg/L	1mg/L	2,5 mg/L	0,5mg/L	1 mg/L	2,5 mg/L	
Nr máx de partículas (part./ml)		-	16968	30030	35068	45785	20348	26010	29955	
Dia do máximo		-	10	9	9	9	8	8	8	
Azoto (mg/L)	Kjeldhal	Inicio	1,1	1,1	1,6	2,1	3,6	1,1	1,1	1,1
		Final	-	2,1	2,7	3,1	4,2	2,7	2,8	3,1
	Amoniacal	Inicio	0,4	0,4	0,9	1,4	2,9	0,4	0,4	0,4
		Final	-	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2
	Nitratos	Inicio	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,9	2,4	3,9
		Final	-	1,0	1,3	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
	Orgânico	Inicio	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
		Final	-	1,9	2,4	2,8	3,8	2,4	2,6	2,9
Fósforo (µg/L)	Total	Inicio	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5
		Final	-	29,5	32,4	31,1	29,5	31,8	29,2	27,6
	Solúvel	Inicio	32,3	32,3	32,3	32,3	32,3	32,3	32,3	32,3
		Final	-	26,3	17,4	14,7	13,2	18,9	15,8	13,1
	Ortofosfatos	Inicio	30,3	30,3	30,3	30,3	30,3	30,3	30,3	30,3
		Final	-	14,7	10,9	8,0	7,7	13,1	9,9	10,2
Pigmentos	Cl-a (mg/m³)	Inicio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		Final	-	9,7	36,6	61,8	105,7	14,2	21,0	46,2
	Feopigmentos (mg/m³)	Inicio	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
		Final	-	26,7	108,3	171,6	251,3	37,3	63,6	135,2
	cl-a/feo	Final	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3

Anexo III – Comportamento das culturas ao longo do tempo

T

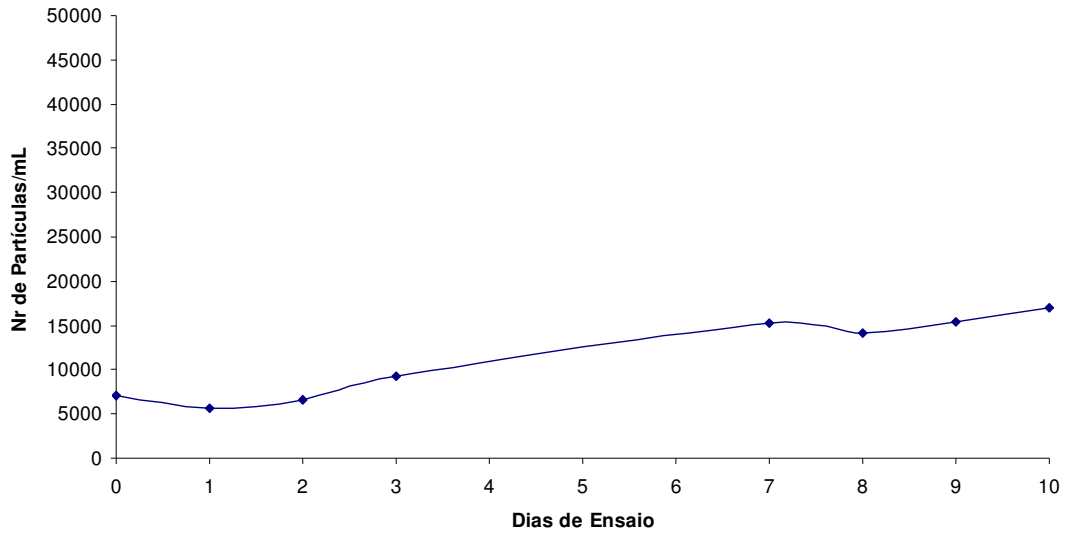


Figura A. 1 - Comportamento do ensaio Testemunha

0,5 NH4

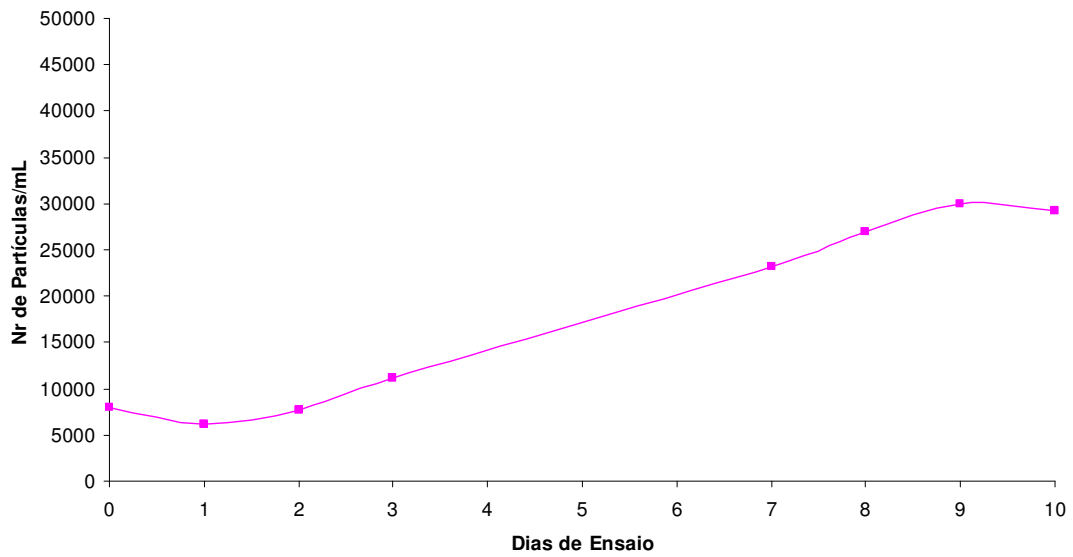


Figura A. 2 - Comportamento do ensaio com adição de 0,5 mg/L de azoto amoniacal

1 NH4

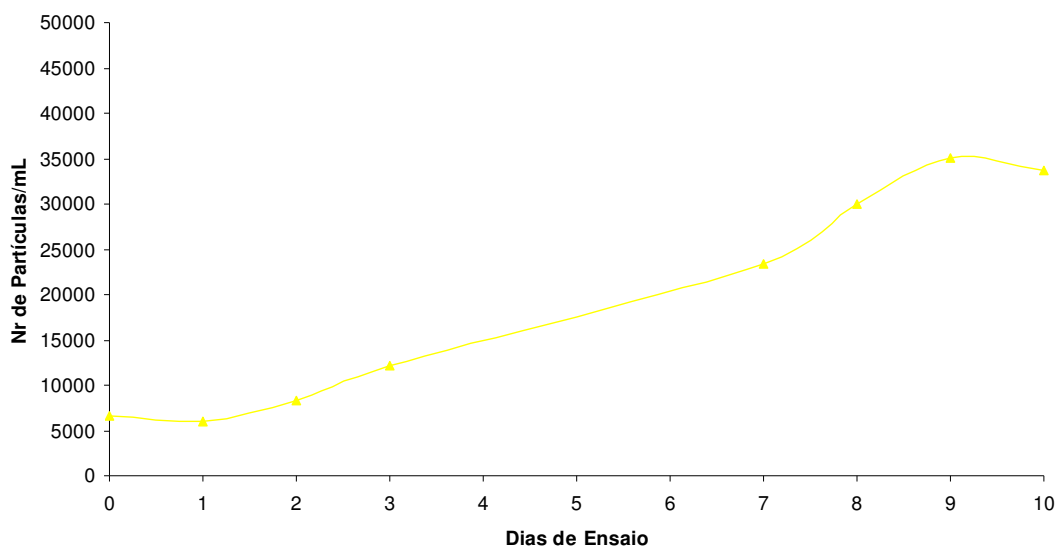


Figura A. 3 - Comportamento do ensaio com adição de 1 mg/L de azoto amoniacal

2,5 NH4

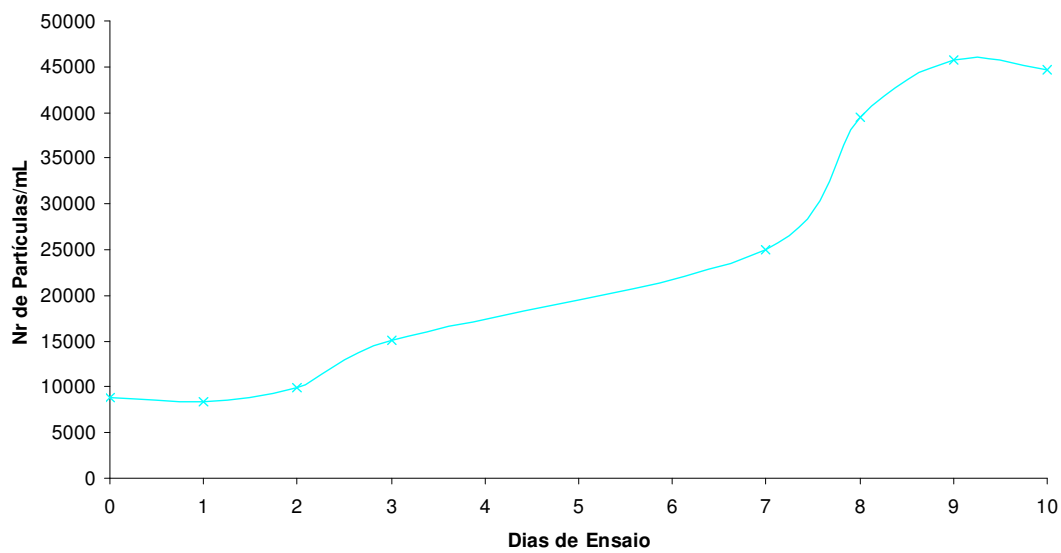


Figura A. 4 - Comportamento do ensaio com adição de 2,5 mg/L de azoto amoniacal

0,5 NO3

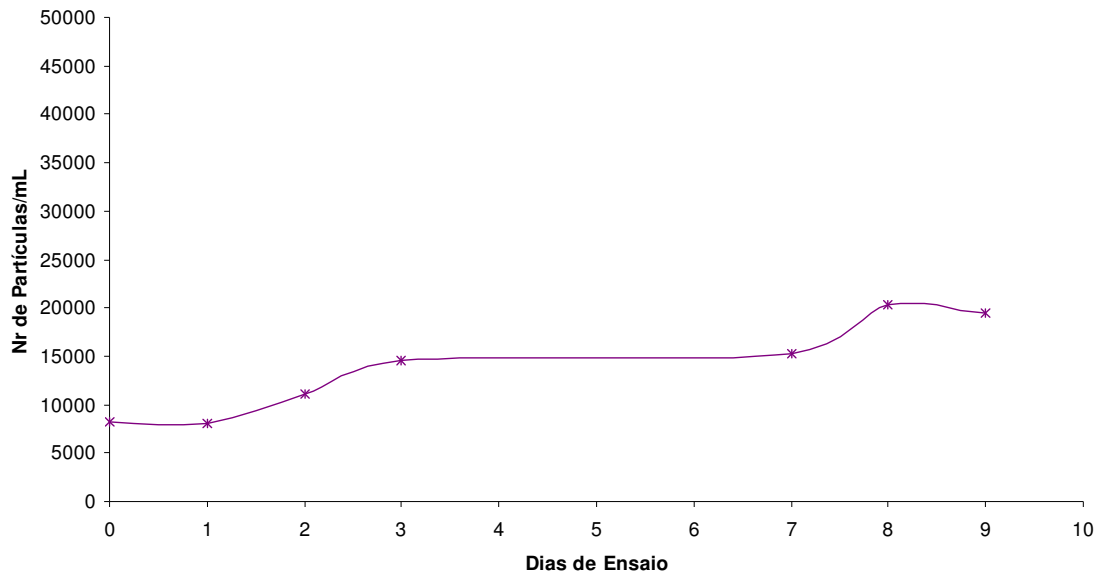


Figura A. 5 - Comportamento do ensaio com adição de 0,5 mg/L de nitratos

1 NO3

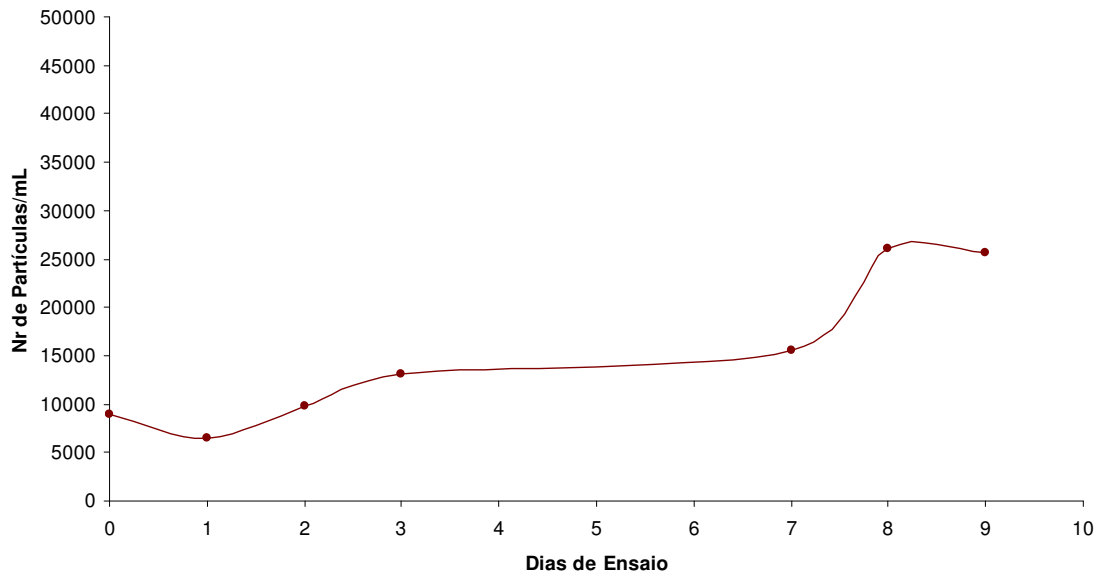


Figura A. 6 - Comportamento do ensaio com adição de 1 mg/L de nitratos

2,5 NO3

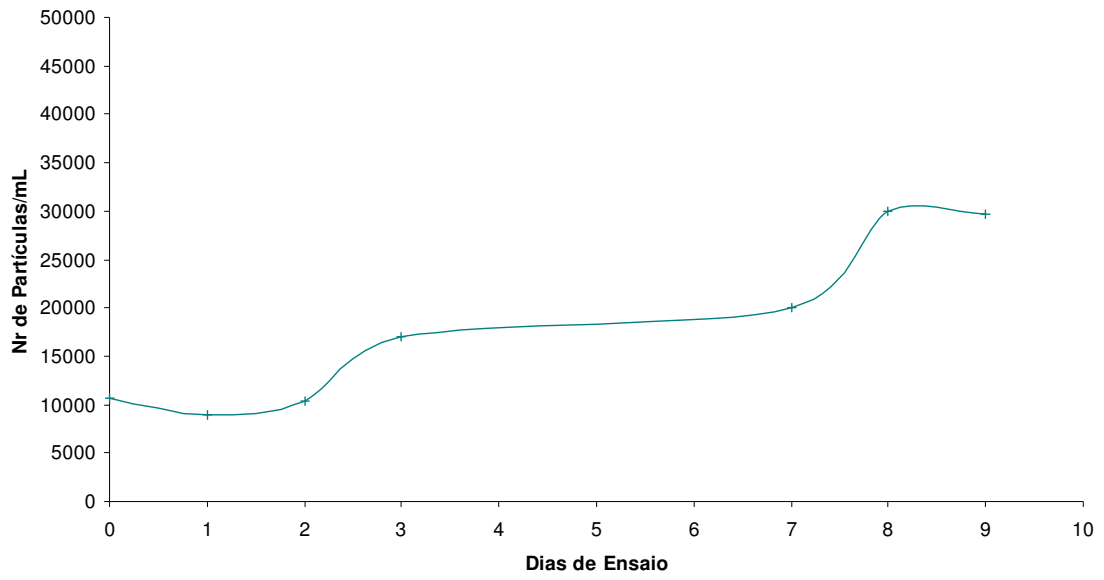


Figura A. 7 - Comportamento do ensaio com adição de 2,5 mg/L de nitratos

Anexo IV – Correlação entre parâmetros avaliados

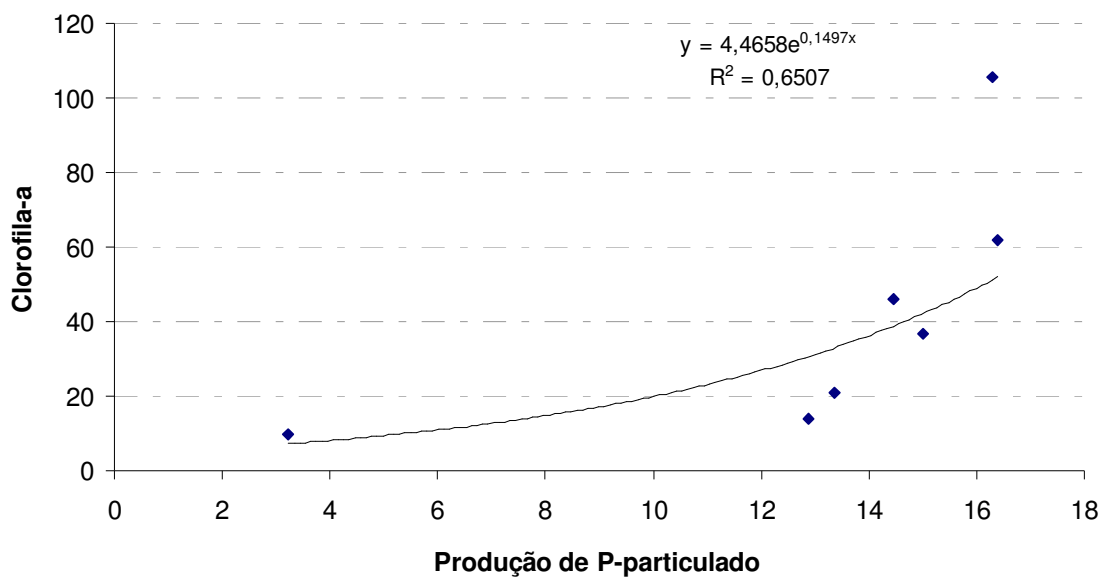


Figura A. 8 - Correlação entre o fósforo particulado produzido (µg/L) e a concentração de clorofila-a (mg/m³) registada no final das culturas

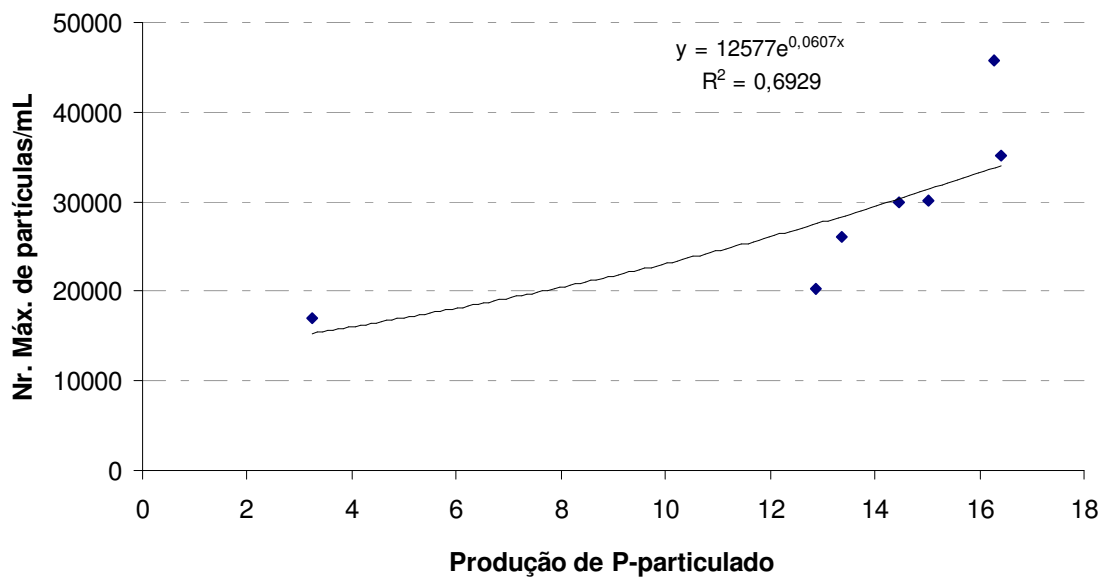


Figura A. 9 - Correlação entre o fósforo particulado produzido (µg/L) e a concentração máxima de partículas (part./mL) registada