

Universidade Nova de Lisboa

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

Estudo dos efeitos da irradiação ultra-sónica na inibição do crescimento de cianobactérias do género *Microcystis* spp.

Ana Catarina Bernardino Claro

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 da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos

Lisboa
2009

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos pela oportunidade concedida, pela orientação e preocupação durante a realização do trabalho;

À Engenheira Helena Muelle pelo apoio incondicional na concretização do trabalho, principalmente na análise e quantificação de microcistinas e na avaliação morfológica das cianobactérias, assim como a inestimável disponibilidade e o excelente ambiente proporcionado;

Ao Doutor Mário Diniz pela disponibilização do equipamento de ultra-sons e pelos conselhos imprescindíveis à realização do trabalho;

À D. Luísa e D. Adélia pela amizade, apoio, incentivo e pelo bom ambiente que proporcionaram ao longo dos meses de trabalho no laboratório;

À Ana Brandão pelo auxílio na evaporação de microcistinas intracelulares em corrente de azoto e pelo agradável convívio no laboratório;

Ao Pedro Costa pelo acesso incondicional ao microscópico utilizado para a avaliação morfológica das cianobactérias;

A todos os colegas de mestrado com quem estabeleci valiosas amizades, especialmente a Ana Caldeira e Ana Madeira que foram fulcrais no meu progresso académico;

A todos os meus amigos pela amizade e incentivo;

Ao Celso pelo apoio incondicional, amizade, companheirismo, compreensão e paciência desde o momento que nos conhecemos;

À minha família, em especial aos meus pais, ao meu irmão e à Vera pelos ensinamentos concedidos, apoio incondicional e pela confiança depositada.

RESUMO

A gestão e as estratégias envolvidas no controlo de *blooms* de cianobactérias têm evidenciado pouco sucesso, por ter efeitos transitórios ou traduzir-se numa poluição secundária. Na sequência da necessidade emergente de métodos alternativos, a tecnologia ultra-sónica surge como um novo método para o rápido controlo e prevenção de *blooms* de cianobactérias em águas eutrofizadas.

No contexto da inibição do crescimento de cianobactérias através da irradiação ultra-sónica, a presente dissertação incidiu no estudo dos efeitos da aplicação dos ultra-sons sobre o crescimento do género *Microcystis* spp., em cultura mista. O sistema de ultra-sons utilizado consistiu num banho de ultra-sons de potência 500 W, com duas frequências possíveis (35 KHz e 130 KHz) e diferentes amplitudes (20% a 100%).

Os resultados experimentais relativos ao crescimento das cianobactérias revelaram que cinco minutos de irradiação ultra-sónica inibem efectivamente a proliferação de cianobactérias, na ordem dos 75% a 85%. A associação da menor frequência (35 KHz) com a maior amplitude (100%) originou a supressão mais acentuada do crescimento da *Microcystis* spp.. Por outro lado, a combinação da frequência e amplitude mais elevadas revelou a menor inibição da densidade celular. A determinação complementar da clorofila *a* e a avaliação morfológica, imediatamente após a sonicação, permitiram de certo modo confirmar os efeitos inibitórios induzidos pelos ultra-sons no género *Microcystis* spp., nomeadamente o colapso dos vacúolos gasosos e a ruptura das células. Aumentos pontuais de oxigénio dissolvido e pH foram verificados após a irradiação ultra-sónica. Estes resultados sugeriram que a peroxidação lipídica, resultante de reacções secundárias de radicais livres produzidos durante a cavitação ultra-sónica, pouca ou nenhuma influência exerceu sobre a integridade das células das cianobactérias.

Foi também considerada a possibilidade da irradiação ultra-sónica induzir aumentos de microcistinas dissolvidas, em consequência da ruptura das células, e a potencial capacidade de degradação dessas toxinas. Concluiu-se que cinco minutos de irradiação ultra-sónica, associada a elevadas frequências e amplitudes (130 KHz e 100%), não provocam um aumento significativo de microcistinas dissolvidas (5%) e promovem uma eventual degradação das microcistinas presentes na fase solúvel, de cerca de 30%.

A avaliação da variação das concentrações de microcistinas permitiu ainda reforçar que a ruptura das células e o colapso dos vacúolos gasosos constituíram os principais mecanismos inibitórios incitados pela irradiação ultra-sónica.

Palavras-chave: *Blooms*; Cianobactérias; Ultra-sons; *Microcystis* spp.; Vacúolos gasosos; Microcistinas.

ABSTRACT

The management and strategies surrounding the control of cyanobacterial blooms have shown little success, to have transient effects or result in a secondary pollution. Following the emerging need of alternative methods, ultrasound technology appears as a new method for the rapid control and prevention of cyanobacterial blooms in eutrophic waters.

In the context of cyanobacterial growth inhibition through ultrasonic radiation, the present dissertation focused in the study of the effects of ultrasound application in the growth of the genus *Microcystis* spp. in mixed cultivation. The ultrasound system used was an ultrasonic bath with 500 W power, with two frequencies (35 kHz and 130 kHz) and different amplitudes (10% to 100%).

The experimental results relative on growth of cyanobacterial revealed that five minutes of ultrasound radiation effectively inhibited the proliferation of cyanobacterial, in order of 75% to 85%. The association of less frequency (35 kHz) with greater amplitude (100%) originated the stronger suppression of the *Microcystis* spp. growth. On the other hand, the combination of higher frequency and amplitude showed the lowest inhibition of cellular density. The complementary determination of chlorophyll *a* and the morphological evaluation, immediately after the sonication, allowed of certain mode confirm the inhibitory effects induced by ultrasound in the genus of *Microcystis* spp., namely the collapse of gaseous vacuoles and the rupture of cells.

One-off increases of dissolved oxygen and pH were verified after the ultrasound radiation. These results suggested that the lipid peroxidation, resultant of the secondary reactions of free radicals produced during ultrasonic cavitation, little or no influence had on the integrity of the cyanobacterial cells.

Was also considered the possibility of ultrasonic radiation induce dissolved microcystins increases, as a consequence of cells rupture, and the potential capacity of degradation of these toxins. It was concluded that five minutes of ultrasonic radiation, associated exclusively at high frequencies and amplitudes (130 KHz and 100%), not cause a significant increase of dissolved microcystins (5%) and promote a degradation casual of present microcystins in the soluble phase of around 30%.

The valuation of microcystins concentrations variation allowed yet reinforce that the cells rupture and the gaseous vacuoles collapse constituted the inhibitory mechanisms main incited by ultrasonic radiation.

Keywords: *Blooms*; Cyanobacteria; Ultrasound; *Microcystis* spp.; Gaseous Vacuoles; Microcystins.

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

μg	Micrograma;
μm	Micrómetro;
atm	Atmosfera;
CO_2	Dióxido de carbono;
H^\bullet	Radical livre de hidrogénio;
H_2	Hidrogénio;
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio;
HCL	Ácido clorídrico;
HNO_2	Ácido nitroso;
HNO_3	Ácido nítrico;
HO_2^\bullet	Perhidroxilo;
KHz	Kilohertz;
KPa	Kilopascal;
MHz	Megahertz;
N_2	Azoto molecular;
NH_4^+	Ião de amónio;
nm	Nanómetro;
NO	Óxido nítrico;
NO_2	Dióxido de azoto;
NO_3^-	Ião nitrato;
O^\bullet	Radical livre de oxigénio;
O_2	Oxigénio molecular;
OH^\bullet	Radical hidroxilo;
P	Fósforo;
rpm	Rotações por minuto;
Unid. Abs.	Unidades de absorvância;
W	Watt.

ABREVIATURAS

DUMO	Desintegrador Ultra-sónico de Matéria Orgânica;
EEA	European Environment Agency;
ETA	Estação de Tratamento de Água;
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais;
MC-LR	Microcistina-LR;
MC-RR	Microcistina-RR;
OD	Oxigénio dissolvido;
US x - 0	Amostra controlo para a determinação de parâmetros abióticos do ensaio x;
US x – A	Amostra submetida aos ultra-sons para a determinação de parâmetros abióticos do ensaio x;
US x - C	Amostra submetida aos ultra-sons para a avaliação da morfologia e do crescimento da <i>Microcystis</i> spp. do ensaio x;
WHO	World Health Organization;
x C	Amostra controlo para a avaliação da morfologia e do crescimento da <i>Microcystis</i> spp. do ensaio x.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES	iv
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE QUADROS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EUTROFIZAÇÃO E FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS.....	2
1.1.1 Conceitos, causas e consequências.....	2
1.1.2 Situação mundial.....	5
1.2 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS	6
1.2.1 Cianobactérias.....	6
1.2.1.1 Classificação e Caracterização Geral.....	6
1.2.1.2 Factores de Formação de Florescências de Cianobactérias	10
1.2.2 Cianotoxinas	17
1.2.2.1 Microcistinas.....	20
1.2.2.2 Casos de intoxicação relacionados com toxinas de cianobactérias	24
1.3 ULTRA-SONS COMO TECNOLOGIA DE TRATAMENTO DE <i>BLOOMS</i>	27
1.3.1 Definição e mecanismo da sonicação	27
1.3.2 Efeitos da irradiação ultra-sónica nas cianobactérias.....	31
1.3.3 Efeitos biológicos nos ecossistemas aquáticos	35
2. OBJECTIVOS	38
3. METODOLOGIA.....	39
3.1 PREPARAÇÕES DAS CULTURAS DE CIANOBACTÉRIAS (CULTURAS MISTAS).....	39
3.2 ENSAIOS COM ULTRA-SONS	40
3.2.1 Selecção dos parâmetros ultra-sónicos (frequência, amplitude e tempo).....	41
3.2.2 Determinação de parâmetros abióticos.....	41
3.2.2.1 Temperatura	41
3.2.2.2 Oxigénio dissolvido	42
3.2.2.3 pH.....	42
3.2.2.4 Turvação	42

3.2.2.5 Sólidos Suspensos Totais (SST)	42
3.2.3 Clorofila <i>a</i> e Feopigmentos	42
3.2.4 Quantificação de microcistinas intracelulares e extracelulares.....	43
3.2.5 Avaliação morfológica por microscopia do género <i>Microcystis</i> spp.....	45
3.2.6 Avaliação da recuperação do crescimento das cianobactérias após sonicação	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 PARÂMETROS ABIÓTICOS, CLOROFILA A E FEPIGMENTOS PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRA-SONS	46
4.1.1 Temperatura.....	46
4.1.2 Oxigénio dissolvido (OD)	47
4.1.3 pH	49
4.1.4 Turvação.....	51
4.1.5 Clorofila <i>a</i> e Feopigmentos	52
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRA-SONS	54
4.2.1 Microcistinas intracelulares	54
4.2.2 Microcistinas extracelulares.....	56
4.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRA- SONS	60
4.3.1 Ensaio 1: Frequência de 35 KHz e amplitude de 20%	60
4.3.2 Ensaio 2: Frequência de 35 KHz e amplitude de 50%	61
4.3.3 Ensaio 3: Frequência de 35 KHz e amplitude de 100%	61
4.3.4 Ensaio 4: Frequência de 130 KHz e amplitude de 20%	62
4.3.5 Ensaio 5: Frequência de 130 KHz e amplitude de 50%	63
4.3.6 Ensaio 6: Frequência de 130 KHz e amplitude de 100%	64
4.3.7 Comparação morfológica entre os vários ensaios	65
4.4 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS APÓS SONICAÇÃO	65
5. CONCLUSÃO	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I.....	84
ANEXO II.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.1.2.1 – a) Secção transversal de uma célula cianobacteriana <i>Microcystis</i> spp. evidenciando um empilhamento hexagonal de vesículas gasosas; b) Vesículas gasosas da <i>Anabaena flos-aquae</i> (imagem direita superior) e da <i>Halobacterium salinarum</i> (imagem direita inferior).	15
Figura 1.2.2.1.1 – Estrutura química a) básica das microcistinas e da b) microcistina-LR.	21
Figura 1.3.1.1 – Cavitação acústica.	28
Figura 1.3.1.2 – Processos oxidativos numa água induzidos pela aplicação de ultra-sons.	29
Figura 1.3.1.3 – Equipamentos de laboratório de ultra-sons: a) Banho de ultra-sons e b) Sonda ultra-sónica.	30
Figura 3.2.1 – Sistema de banho de ultra-sons.	40
Figura 4.1.1.1 – Variação da temperatura de cada ensaio.	46
Figura 4.1.1.2 – Acréscimo percentual da temperatura de cada ensaio.	46
Figura 4.1.2.1 – Variação do oxigénio dissolvido de cada ensaio.	47
Figura 4.1.2.2 – Acréscimo percentual do oxigénio dissolvido de cada ensaio.	48
Figura 4.1.3.1 – Variação do pH de cada ensaio.	49
Figura 4.1.3.2 – Acréscimo percentual do pH de cada ensaio.	49
Figura 4.1.4.1 – Variação da turvação de cada ensaio.	51
Figura 4.1.4.2 – Redução percentual da turvação de cada ensaio.	51
Figura 4.1.5.1 – Redução percentual de clorofila <i>a</i> de cada ensaio.	53
Figura 4.2.1.1 – Redução percentual de microcistinas na biomassa após sonicação.	55
Figura 4.2.2.1 – Aumento percentual de microcistinas no meio solúvel após sonicação.	57
Figura 4.3.1.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp. na a) amostra controlo (US 1 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 1 - C), para uma resolução de 100×.	60
Figura 4.3.2.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp na a) amostra controlo (US 2 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 2 - C), para uma resolução de 100×.	61
Figura 4.3.3.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp na a) amostra controlo (US 3 - 0) e b) e c) amostra submetida aos ultra-sons (US 3 - C), para uma resolução de 100×.	62
Figura 4.3.4.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp na a) amostra controlo (US 4 - 0) e b) e c) amostra submetida aos ultra-sons (US 4 - C), para uma resolução de 100×.	62
Figura 4.3.5.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp na a) amostra controlo (US 5 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 5 - C), para uma resolução de 100×.	63
Figura 4.3.6.1 – Observação microscópica da <i>Microcystis</i> spp na a) amostra controlo (US 6 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 6 - C), para uma resolução de 100×.	64
Figura 4.4.1 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 1 (35 KHz e 20%).	66

Figura 4.4.2 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 2 (35 KHz e 50%).....	66
Figura 4.4.3 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 3 (35 KHz e 100%).....	66
Figura 4.4.4 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 4 (130 KHz e 20%).....	67
Figura 4.4.5 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 5 (130 KHz e 50%).....	67
Figura 4.4.6 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 6 (130 KHz e 100%).....	67
Figura 4.4.7 – Amostras controlo (xC) e sonicada (USx-C) após 14 dias de avaliação do crescimento dos ensaios: a) Ensaio 1 (35KHz e 20%); b) Ensaio 2 (35 KHz e 50%); c) Ensaio 3 (35 KHz e 100%); d) Ensaio 4 (130 KHz e 20%); Ensaio 5 (130 KHz e 50%); Ensaio 6 (130 KHz e 100%).....	71

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.2.2.2. 1 – Exemplos de casos letais de animais por ingestão de cianobactérias.....	25
Quadro 1.2.2.2. 2 – Mortalidade massiva de espécies de flamingos após a ingestão ou exposição a cianobactérias.....	25
Quadro 1.2.2.2. 3 – Exemplos de patologias humanas associadas à exposição a cianobactérias.....	26
Quadro 1.3.3. 1 – Espécies de algas efectivamente eliminadas pela radiação ultra-sónica.....	36
Quadro 3.1. 1 – Idade das culturas correspondente a cada ensaio.....	39
Quadro 3.1. 2 – Amostras utilizadas para cada ensaio.....	40
Quadro 4.1.5. 1 – Concentrações de clorofila <i>a</i> antes e após a sonicação e concentrações de feopigmentos das amostras controlo (US-0).....	52
Quadro 4.2.1. 1 – Quantificação de microcistinas na biomassa de cada ensaio.....	54
Quadro 4.2.2. 1 – Quantificação de microcistinas no meio solúvel de cada ensaio.....	56
Quadro 4.4. 1 – Percentagens de inibição do crescimento após 14 dias da sonicação, de redução das concentrações de clorofila <i>a</i> e de microcistinas intracelulares para cada ensaio.....	68

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional e a consequente intensificação das actividades agrícolas e industriais, paralelamente a uma má gestão dos recursos hídricos, têm contribuído para a evolução da eutrofização de águas superficiais de sistemas de água doce, utilizados para actividades recreativas e para consumo humano (Bartram *et al.*, 1999).

O reconhecimento do problema tomou proporções a nível mundial, dados os potenciais efeitos nefastos nos ecossistemas e na saúde humana, desde a perda de espécies indígenas à limitação dos usos da água (Bartram *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999).

A maioria dos estudos sobre a eutrofização centram-se nos ecossistemas de água doce (lagos e albufeiras, principalmente), mas isso não significa que sejam apenas afectados estes sistemas (Smith *et al.*, 1999; Vasconcelos, 2006). Os sistemas de água doce estão sujeitos a uma maior influência de fontes de poluição externas e internas, comparativamente aos oceanos, de maiores área superficial e volume de água (Vasconcelos, 2006).

No entanto, a evolução natural dos ecossistemas aquáticos (produção biológica) pode levar à sua eutrofização mesmo quando a influência antropogénica é insignificante ou inexistente (Bartram *et al.*, 1999). Este fenómeno natural é claramente visível em lagos naturais e em rios de áreas remotas, como na região da Amazónia ou nos lagos suíços, a elevadas altitudes (Vasconcelos, 2006).

De facto, a eutrofização tem sido acelerada pela interferência humana, desde que civilizações antepassadas iniciaram a administração de adubo ao solo para aumentar a produtividade de cereais (Vasconcelos, 2006). Alterações de grande magnitude na estrutura e função do ambiente tiveram uma evolução exponencial a partir da revolução industrial. Cerca de 1/3 a 1/2 da superfície terrestre tem sido transformada pelo Homem com profundos impactos nas comunidades terrestres e aquáticas, pela interferência nos ciclos do carbono, azoto e fósforo. O *input* de azoto no meio terrestre, por exemplo, foi aproximadamente duplicado por actividades humanas e presume-se ainda um aumento contínuo da introdução deste nutriente nos solos. Entre as décadas de 50 e 90, a produção global de fertilizantes para fins agrícolas aumentou de menos de 10 milhões de toneladas métricas para 80 milhões de toneladas métricas de azoto (Smith *et al.*, 1999).

A disponibilidade de nutrientes, especialmente de azoto e fósforo, nos meios hídricos é essencial para o bom funcionamento dos ecossistemas e para o desenvolvimento da

biomassa aquática. A carência de qualquer de um destes nutrientes pode limitar o crescimento de algas. Porém, nas últimas décadas, a presença de nutrientes nos sistemas aquáticos tem sido excessiva. Como resultado destas fontes exorbitantes de nutrientes, a proliferação de fitoplâncton e a consequente deterioração da qualidade da água constituem uma das maiores preocupações sobre a temática dos recursos hídricos (Bartram *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999).

Os esforços desenvolvidos para o uso racional da água têm igualmente potenciado o estado eutrófico de muitas águas superficiais. A geração de energia, por exemplo, exerce um impacto negativo nas águas estuarinas e costeiras, nomeadamente no transporte de sedimentos e substâncias associadas (nutrientes vegetais) que, por sua vez, podem favorecer o desenvolvimento do fitoplâncton, como por exemplo as cianobactérias. O aumento do tempo de retenção e da exposição à luz solar das áreas superficiais são as principais consequências da construção de barragens. Estes factores, para além das condições redutoras presentes nos sedimentos, alteram as condições de crescimento dos organismos, promovendo oportunidades de crescimento de algas e cianobactérias e até a formação de *blooms*. Em Portugal, estima-se uma redução de 80% no transporte sedimentar dos rios para o mar subsequente à construção destes empreendimentos (Fonseca, 2002).

É de realçar que o problema da eutrofização se deve sobretudo às actividades humanas. A tendência geral presenciada mundialmente é o aumento das concentrações de poluentes nas águas superficiais associado ao aumento da urbanização (Bartram *et al.*, 1999).

1.1 EUTROFIZAÇÃO E FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS

1.1.1 Conceitos, causas e consequências

Os ecossistemas podem ser distinguidos ou classificados mediante o seu estado trófico, em termos de concentrações em fósforo e azoto, e a sua densidade de populações fitoplanctónicas. Águas pobres em nutrientes e com pequenas populações de algas planctónicas são denominadas por oligotróficas, enquanto águas ricas em nutrientes com quantidades avultadas de fitoplâncton são consideradas eutróficas (Prescott *et al.*, 1998; Wetzel, 1993). O estado intermédio destas duas classes é designado por mesotrófico (Smith *et al.*, 1999).

Deste modo, a eutrofização é um processo através do qual as massas de água se tornam mais ricas em nutrientes, daí resultando o aumento da produtividade primária dos ecossistemas, nomeadamente da biomassa algal (Wetzel, 1993).

A descarga de efluentes domésticos e industriais assim como as actividades agrícolas (uso de pesticidas e fertilizantes) e a gestão inadequada das bacias hidrográficas constituem as principais causas antropogénicas, determinantes para o desequilíbrio dos ecossistemas (Vasconcelos, 2006). Para além das actividades antropogénicas, fontes naturais podem compelir o declínio dos ecossistemas. Os fogos florestais e a lixiviação de nutrientes de locais a montante de um sistema aquático são exemplos de fontes naturais (Vasconcelos, 2006).

O aumento dos níveis de nutrientes resulta no incremento da produção biológica das massas hídricas. Estas condições associadas a factores ambientais como temperaturas e pH elevados e turbulência reduzida são favoráveis a desenvolvimentos massivos do fitoplâncton conhecidos por florescências ou *blooms* (Bartram *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999).

Uma diversidade de organismos do fitoplâncton presentes nos sistemas de água doce apresentam capacidade de formar *blooms*, mas os grupos de organismos de maior representatividade e preocupação são os flagelados, as diatomáceas e as cianobactérias (Bold & Wynne, 1985; Vasconcelos, 2006). No entanto, as cianobactérias constituem os organismos do fitoplâncton mais associados à eutrofização de sistemas de água doce (Vasconcelos, 2006), devido provavelmente a vantagens competitivas nutricionais, morfológicas e fisiológicas (Bartram *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1998).

A presença de cianobactérias nas massas hídricas afecta a qualidade da água em termos de pH, oxigénio dissolvido, turvação, sabores e odores e toxicidade (Knappe *et al.*, 2004; Vasconcelos, 2006). A variação do pH, numa água dominada por cianobactérias, caracteriza-se por valores elevados durante o dia e baixos durante a noite. Durante a fotossíntese, as cianobactérias utilizam a luz solar, como fonte de energia, para fixarem o carbono inorgânico e, posteriormente, formarem novas e/ou repararem células. A absorção de dióxido de carbono (CO₂) pelos microrganismos aumenta a concentração de iões hidroxilo (OH⁻) na água e, inevitavelmente, o pH. Valores de pH superiores a 10 são observados numa massa hídrica com cianobactérias presentes. Após a fotossíntese, no período nocturno, as cianobactérias realizam a respiração onde o oxigénio é consumido e o CO₂ é produzido. Como resultado, os níveis de pH diminuem durante este período (Knappe *et al.*, 2004). Por conseguinte, a alteração da actividade fotossintética diurna para a actividade respiratória

nocturna induz variações no pH das massas hídricas, características da presença de cianobactérias, bem como de algas (Vasconcelos, 2006).

Flutuações bastante significativas de oxigénio dissolvido (OD) são também observadas numa massa de água quando nela subsistem populações de cianobactérias e algas. O OD é um subproduto da actividade fotossintética e, por isso, os níveis de OD aumentam para valores acima do ponto de saturação durante o período diurno (sobressaturação em oxigénio). Durante o período nocturno, estes níveis decrescem significativamente pelo facto do oxigénio ser consumido durante a actividade respiratória de todos os organismos aquáticos. Especialmente, em áreas próximas do fundo (sedimentos) ou termoclina, os níveis de oxigénio à noite podem ser suficientemente baixos para provocar a morte de algumas espécies mais sensíveis, como os peixes. A depleção do oxigénio na água pode resultar do declínio da matéria orgânica que o biota constituem (Vasconcelos, 2006). Além de problemas secundários como a morte de espécies sensíveis, a carência de oxigénio dissolvido pode induzir condições anaeróbias que promovem a libertação de substâncias tóxicas e compostos de fósforo a partir dos sedimentos. Como tal, os sedimentos podem constituir uma fonte adicional de nutrientes, no caso da libertação de fósforo ser suficiente para retomar o processo de eutrofização (Mur et al., 1999).

Os *blooms* superficiais de cianobactérias podem aumentar a turvação de uma massa de água. Correlações entre o aumento da turvação da água e a presença de *blooms* são dubitativas, uma vez que as flutuações de turvação são frequentemente derivadas de outros factores, como eventuais tempestades. De facto, o desenvolvimento de *blooms* pode coincidir com a redução dos níveis de turvação de uma massa de água após eventuais tempestades (Knappe, et al., 2004). No entanto, durante a ocorrência de um *bloom*, a transparência da água pode ser tão baixa como 1 cm a 2 cm, suficiente para perturbar a ecologia integral do ecossistema ao impedir a penetração da luz para maiores profundidades da água. Apenas espécies com capacidade de migração através da coluna de água, como algumas cianobactérias, podem ser bem sucedidas nestes ambientes (Vasconcelos, 2006).

A presença de cianobactérias nas origens de água para consumo humano e/ou em águas recreativas resultam frequentemente em episódios de sabores e odores desagradáveis, especialmente quando o *bloom* entra em declínio. O género *Microcystis* spp., por exemplo, é responsável pela produção de compostos ácidos, linolénico e β -ciclocitral, que causam sabores e odores desagradáveis (Knappe et al., 2004).

A produção de compostos bioactivos com propriedades tóxicas por parte de muitas espécies de cianobactérias é igualmente preocupante e nefasta para o ambiente. Estas toxinas podem causar a morte não só de organismos aquáticos, que entrem em contacto directo, como também de animais terrestres (gado, animais domésticos, aves aquáticas) e, mais raramente, de humanos (Vasconcelos, 2006).

1.1.2 Situação mundial

Descrições ocasionais efectuadas por viajantes, historiadores e, pelo menos, por um dramaturgo (W. Shakespeare: *The Merchant of Venice*) indicaram a existência de escumas planctónicas e *blooms* na Europa, desde há dois milénios pelo menos. Em 1188, Geraldus Cambrensis observou cianobactérias flutuantes no Lago Llangorse (País de Gales), ao descrever que o lago apresentava, por vezes, uma coloração verde brilhante (Codd *et al.*, 2005).

Somente a meio do século XX é que a eutrofização foi reconhecida como um problema de poluição de muitos lagos e albufeiras da Europa ocidental e Norte da América. Desde então, inúmeros casos de eutrofização foram identificados em diversas regiões do mundo. Estudos recentes mostram que 54% dos lagos na Região Ásia-Pacífico são eutróficos, assim como 53% dos lagos na Europa, 48% na África e 41% na América do Norte e Sul (Bartram *et al.*, 1999).

Dada a gravidade da situação, têm sido desenvolvidos esforços para reverter a situação que vão desde a melhoria dos processos de tratamento de águas residuais até à utilização mais racional de fertilizantes. Na Europa, por exemplo, foram implementadas directivas relativas ao tratamento de águas residuais e à aplicação de nitratos inorgânicos nos solos agrícolas, entre outras. Durante a década de 90, a qualidade dos rios e lagos na Europa melhorou significativamente, fundamentalmente devida a progressos ao nível do tratamento de águas residuais e industriais (redução nas concentrações de fósforo). No entanto, as concentrações de nitratos nos rios permaneceram relativamente estáveis no mesmo período, sendo maiores nos países caracterizados por possuírem uma agricultura intensiva (Europa Ocidental) (EEA, 2005).

Em Portugal, a maior incidência de eutrofização é principalmente em albufeiras e estuários. Esta situação é preocupante uma vez que grande parte da população é abastecida a partir de

albufeiras. Exemplos dessas albufeiras são o Torrão, Bravura e Aguieira. Os rios portugueses com maior tendência para a eutrofização são o Minho, Douro, Tejo e Guadiana, devido ao fluxo reduzido que apresentam temporariamente. Na região centro de Portugal, entre Aveiro e Figueira da Foz, existem alguns lagos naturais que apresentam *blooms* sazonais de cianobactérias (Vasconcelos, 2006).

Contudo, o desenvolvimento tecnológico ao nível das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), assim como a implementação de directivas e medidas nacionais relativas aos nutrientes, têm contribuído para a redução da afluência de nutrientes aos ecossistemas aquáticos (EEA, 2005).

1.2 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

1.2.1 Cianobactérias

1.2.1.1 Classificação e Caracterização Geral

As cianobactérias são das primeiras formas vivas a colonizar a Terra, há cerca de 3,5 biliões de anos (Owuor *et al.*, 2007 e Wolk, 1973) durante a Era Pré-Câmbrica (HoeK *et al.*, 1995). Evidências paleontológicas sugerem que as cianobactérias, sendo dos primeiros organismos fotossintéticos na Terra, desempenharam um papel fundamental na evolução da atmosfera terrestre (HoeK *et al.*, 1995).

São diversas as designações estabelecidas para estes organismos, tais como: algas verdes-azuis, Cyanophyta (cyano [grego] = azul), Myxophyceae (myx [grego] = limo), Cyanoprokaryota, entre outras (Bartram *et al.*, 1999; Wetzel, 1993). Sistemas de classificação mais antigos indicavam cerca de 150 géneros e 2000 espécies de cianobactérias (Mur *et al.*, 1999; HoeK *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Recentemente, o número destes organismos foi reduzido para 42 géneros e 62 espécies (Prescott *et al.*, 1998).

As cianobactérias têm a particularidade de partilharem características estruturais e fisiológicas com as bactérias e características funcionais com as plantas dos sistemas aquáticos (Wetzel, 1993). Dadas as características celulares análogas às bactérias, as cianobactérias são consideradas organismos procariotas (ausência de núcleo, o

nucleoplasma não é revestido por uma membrana dupla), apesar de evidenciarem semelhanças com algas eucariotas e plantas superiores por possuírem clorofila *a* e fotossistema II (Prescott *et al.*, 1998; Wetzel, 1993).

A maioria das cianobactérias são fotoautotróficas aeróbias, cujos processos vitais requerem simplesmente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese representa o principal modo de metabolismo energético destes organismos (Mur *et al.*, 1999).

Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrinas) estão localizados nas lamelas fotossintéticas dos tilacóides, com movimento livre no citoplasma (na periferia celular), ao contrário dos eucariotas onde a fotossíntese se processa no interior de organelos especializados, os cloroplastos (Mur *et al.*, 1999; HoeK *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1998; Wolk, 1973). Outra capacidade intrínseca às cianobactérias consiste na realização da fotossíntese oxigénica utilizando a água como dador de electrões e obtendo oxigénio como subproduto (Mur *et al.*, 1999; Owuor *et al.*, 2007; Prescott *et al.*, 1998; Wetzel, 1993).

De acordo com a variação da proporção ou natureza dos pigmentos acessórios presentes nas células, estas podem exibir variadas colorações, desde verde-azulado a violeta e, por vezes, verde ou vermelha, embora a maioria sejam verdes-azuis devido à presença dominante da ficocianina (HoeK *et al.*, 1995 Prescott *et al.*, 1998 e Smith *et al.*, 1999).

Tal como as eubacterias, a parede celular das cianobactérias contem peptidoglicano, revestida por uma camada de lipopolissacarídeos, sendo consideradas bactérias gram-negativas. Grande maioria das células é envolvida por uma mucilagem constituída por polissacarídeos (HoeK *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1998).

A reprodução das cianobactérias é exclusivamente assexuada, por fissão binária (divisão celular simples) ou por fragmentação de tricomas (Mur *et al.*, 1999; HoeK *et al.*, 1995).

A diversidade morfológica exibida pelas cianobactérias compreende formas unicelulares, coloniais e filamentosas, com um diâmetro que pode variar entre 1 µm a 10 µm (Mur *et al.*, 1999; Owuor *et al.*, 2007; Prescott *et al.*, 1998; Wetzel, 1993). Uma parte significativa destas formas são revestidas por mucilagem, individualmente ou por toda a colónia (Wetzel, 1993). O género *Microcystis* spp., por exemplo, forma colónias cujas células individuais se agregam através da segregação de mucilagem, enquanto os géneros *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp. e *Oscillatoria* spp. são formas filamentosas sem qualquer invólucro ou matriz viscosos (Knappe *et al.*, 2004).

A maioria das cianobactérias é do tipo coccóide, pertencentes à família *Chroococcaceae* (géneros *Microcystis* spp., *Coelosphaerium* spp. e *Coccochloris* spp., por exemplo). As famílias filamentosas incluem *Oscillatoriaceae*, *Nostocaceae* e *Rivulariaceae* (géneros *Oscillatoria* spp., *Lyngbya* spp., *Aphanizomenon* spp. e *Anabaena* spp.) (Wetzel, 1993). Todavia, algumas colónias filamentosas evidenciam uma capacidade de diferenciação celular. A reprodução vegetativa (fragmentação dos tricomas) é a mais comum quando as condições são favoráveis ao crescimento das filamentosas, mas sob condições mais agressivas, numerosas espécies podem formar esporos ou acinetos, mais resistentes e de maiores dimensões. Os heterocistos são um terceiro tipo de células diferenciadas que estas cianobactérias podem desenvolver, de parede espessa, contendo a enzima nitrogenase cuja função é a fixação do azoto atmosférico (Owuor *et al.*, 2007; Wetzel, 1993). Esta enzima é fortemente sensível ao oxigénio, sendo a sua actividade redutora inibida na presença deste elemento. No entanto, algumas cianobactérias sem heterocistos têm também aptidão para fixar azoto quando o ambiente circundante é anaeróbio (condições anóxicas), como as espécies estuarinas *Microcoleus chthonoplastes* e *Lyngbya aestuarii*. Ao contrário das espécies dotadas de heterocistos, estas apresentam uma separação temporal, e não espacial, dos processos de fixação de azoto e da fotossíntese oxigénica (HoeK *et al.*, 1995; Wetzel, 1993).

Outras características particulares das cianobactérias que explicam o seu sucesso ecológico, além da fixação do azoto, são a presença de vesículas gasosas em muitas espécies e a sua capacidade de armazenamento substancial de nutrientes essenciais.

A presença de vesículas gasosas no interior das células de cianobactérias fornece-lhes vantagens competitivas. Estes organelos celulares são inertes, ocos e preenchidos por gases que formam os chamados vacúolos gasosos. Nas cianobactérias, as vesículas gasosas apresentam-se maioritariamente sob a forma hexagonal como numa colmeia (Walsby, 1994). Esta vantagem ecológica é de extrema importância para as cianobactérias uma vez que permite a regulação do respectivo movimento vertical na coluna de água, mediante as suas necessidades fisiológicas (por exemplo: exploração de recursos nutricionais e condições ideais de luminosidade) favoráveis ao seu crescimento e sobrevivência (Mur *et al.*, 1999; Walsby, 1994).

Os nutrientes ou produtos de reserva são armazenados no interior do citoplasma, mais especificamente em inclusões citoplasmáticas, quando as concentrações de nutrientes

particulares são elevadas (Mur *et al.*, 1999). O amido é a principal substância de reserva das cianobactérias, molécula semelhante ao glicogénio das plantas superiores, permanece entre os tilacóides. Outras reservas essenciais ao crescimento das cianobactérias são os grânulos de cianoficina (polímeros constituídos pelos aminoácidos arginina e asparginina) que se tendem a acumular próximos das paredes das formas coloniais ou filamentosas ou na fronteira entre o centroplasma e o cromatoplasma. As cianobactérias são capazes de capturar rapidamente minerais de azoto (N) e fósforo (P), que são posteriormente armazenados sob a forma de grânulos de cianoficinas e polifosfatos. Estas reservas permitem que estes microrganismos mantenham o crescimento activo mesmo quando a água, onde se encontram, apresenta depleção em N e P devida à actividade de outras algas (HoeK *et al.*, 1995).

De grande flexibilidade ecológica, as cianobactérias desenvolvem-se nos mais diversos habitats, em águas salgadas, salobras e doces, em nascentes frias e quentes e até em ambientes inóspitos (desertos e glaciares, por exemplo) onde outras microalgas não são capazes de sobreviver (Mur *et al.*, 1999; HoeK *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1998). No entanto, a maioria das cianobactérias habitam em águas doces. O género *Anabaena* spp., por exemplo, reproduz-se rapidamente em lagoas e lagos quentes e eutróficos, formando florescências (Prescott *et al.*, 1998).

Todavia, as cianobactérias florescem preferencialmente em ambientes límnicos e marinhos, em condições neutro-alcálicas (pH entre 7 e 9) e sob temperaturas entre 15 °C e 30 °C.

As cianobactérias são frequentemente encontradas no fitoplâncton de águas doces calmas. Nos lagos temperados, estes organismos geralmente formam populações densas após o início da estratificação da coluna de água no final da Primavera, quando uma camada superior quente (epilimnion), menos densa, se estabelece acima de uma camada fria profunda (hipolimnion). No final da Primavera e início do Verão observa-se frequentemente o crescimento de populações de formas filamentosas, como as espécies *Anabaena* ou *Aphanizomenon*, enquanto espécies, como *Microcystis aeruginosa*, se tornam mais abundantes no meio do Verão.

As cianobactérias podem ser consideradas como purificadoras naturais de águas superficiais, mas a crescente actividade antropogénica (*input* excessivo de nutrientes - eutrofização), conjuntamente com determinados factores ambientais, têm contribuído para o desenvolvimento excessivo destes organismos, os chamados *blooms*. Estes *blooms*, para

além de afectarem a qualidade da água, podem ainda causar problemas de maior complexidade para os ecossistemas aquáticos e para a saúde pública, quando as espécies presentes são produtoras de metabolitos secundários tóxicos (Mur *et al.*, 1999).

1.2.1.2 Factores de Formação de Florescências de Cianobactérias

O sucesso ecológico das cianobactérias resulta de relações complexas e dinâmicas entre factores físicos, químicos e biológicos. Para a compreensão de tal sucesso, é necessário considerar uma gama de factores ambientais e relacioná-los com as propriedades fisiológicas de cada espécie e com a magnitude das alterações. Dos factores ambientais determinantes destacam-se: temperatura e estratificação térmica, intensidade luminosa, pH e disponibilidade em nutrientes. Entre os factores físicos evidenciam-se a existência de vesículas gasosas. Cada espécie possui uma gama de tolerância para cada factor, verificando-se um desenvolvimento mais rápido de uma determinada espécie quando há uma combinação óptima dos factores apesar de ser difícil atingir o desenvolvimento e produtividade máximos nas condições naturais (Mur *et al.*, 1999; Wetzel, 1993). As características que conferem uma maior competitividade às espécies são relativas, devido à facilidade de alteração das condições físicas e bióticas. A resposta aos diversos factores é uma característica de cada espécie (Wetzel, 1993). Deste modo, distribuições sazonais são verificadas a nível mundial.

Temperatura e Estratificação Térmica

No geral, as cianobactérias apresentam uma maior tolerância a temperaturas elevadas que as algas verdes e diatomáceas (Mur *et al.*, 1999; Wetzel, 1993). As taxas de crescimento mais elevadas da maioria das cianobactérias são atingidas para temperaturas superiores a 25 °C. Estas temperaturas podem explicar a dominância das cianobactérias em climas temperados durante os meses de Verão e durante todo o ano em climas tropicais (Mur *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1998). O género *Microcystis* spp., por exemplo, apresenta taxas de crescimento baixas a temperaturas inferiores a 13 °C e 15 °C e um crescimento máximo a temperaturas entre 27 °C e 37 °C (Knappe *et al.*, 2004).

Cianobactérias termofílicas apresentam crescimentos óptimos a temperaturas superiores a 45 °C, existindo espécies que realizam a fotossíntese a temperaturas constantes tão elevadas como 74 °C (Prescott *et al.*, 1998; Wetzel, 1993).

A estratificação térmica de lagos e albufeiras desempenha igualmente um efeito determinante na sucessão das algas e, em particular, das cianobactérias em águas termicamente estratificadas, cuja coluna de água é estável. Em resultado da estratificação térmica, a depleção de nutrientes no epilimnion pode limitar o crescimento de algas eucariotas. As cianobactérias, por sua vez, possuem características que lhes permitem ter sucesso nessas massas hídricas. Alguns géneros possuem vacúolos gasosos que lhes facultam a aptidão de migrar em profundidade na coluna de água mediante as respectivas necessidades, outros têm capacidade de fixar o azoto atmosférico e uma outra parte sobrevive sob condições fracas de luminosidade no metalimnion (Knappe *et al.*, 2004).

Intensidade Luminosa

O principal metabolismo energético das cianobactérias, a fotossíntese, é fortemente dependente da intensidade luminosa. Este factor é, por isso, limitante ao crescimento efectivo das cianobactérias e das algas.

Muitas cianobactérias exibem uma enorme sensibilidade à longa exposição a elevadas intensidades luminosas. No entanto, as cianobactérias que formam florescências à superfície aparentam uma adaptação fisiológica a estas condições, através de uma produção adicional de carotenóides que protegem as células da foto-inibição (Mur *et al.*, 1999). O género *Microcystis* spp., por exemplo, é tolerante a elevadas intensidades luminosas, formando *blooms* densos e compactos à superfície da água. Scott *et al.* (1981), citados por Owuor *et al.* (2007), sugeriram que este género se adapta a estas intensidades pela redução da clorofila *a*, enquanto sob condições de fraca luminosidade, ou mesmo na escuridão, há uma maior síntese daquele pigmento fotossintético. Reynolds (1997), citado por Knappe *et al.* (2004), demonstrou existirem quantidades mais elevadas de clorofila *a* à superfície, na ordem dos 679 µg/L, e menores em profundidade, entre 49 µg/L e 3 µg/L. Estes *blooms* superficiais podem induzir uma turvação substancial (turvação biogénica) na água, impedindo a penetração da luz para camadas mais profundas e, conseqüentemente, diminuindo a produtividade do fitoplâncton presente nas camadas inferiores. Ainda assim, algumas

espécies planctónicas do género *Oscillatoria* spp. florescem efectivamente sob condições de fraca luminosidade, no metalimnion de lagos estratificados (Knappe *et al.*, 2004).

pH

A presença de cianobactérias numa massa hídrica pode conduzir a valores de pH elevados, superiores a 10. Este aumento deve-se ao consumo de dióxido de carbono pelos organismos durante o processo fotossintético. O dióxido de carbono presente na água é utilizado como fonte de carbono para o desenvolvimento de novas células. A extracção de CO₂ da água faz aumentar o pH, uma vez que os níveis de bicarbonatos e carbonatos são reduzidos de modo a compensar o CO₂ extraído (Knappe *et al.*, 2004; Paerl & Ustach, 1982; Whitton & Potts, 2000).

Cianobactérias do género *Microcystis* spp., por exemplo, têm a capacidade de competir para valores de pH elevados. No entanto, Talling (1976), citado por Knappe *et al.* (2004), demonstrou que as taxas de crescimento deste género começam a diminuir para valores de pH superiores a 11, dado que as limitações do pH prevalecem às limitações de carbono inorgânico. Owuor *et al.* (2007) referiu que a limitação do crescimento das cianobactérias pode estar correlacionada com concentrações baixas de CO₂ e pH elevados ou vice-versa (pH entre 4 e 5). Estas duas condições podem inibir a divisão celular e, conseqüentemente, influenciar a produção de biomassa (Owuor *et al.*, 2007). Shapiro (1997), citado por Knappe *et al.* (2004), sugeriu que a dominância das cianobactérias é resultado de grandes cinéticas de consumo de CO₂ sob condições de baixas concentrações em CO₂ livre, quando comparadas com outras classes de algas.

Todavia, as cianobactérias apresentam um crescimento óptimo entre 7,5 e 10, parecendo ser menos dominantes em meios ácidos (Owuor *et al.*, 2007).

Disponibilidade em nutrientes

A produtividade em águas doces é geralmente limitada pela concentração de macro e micronutrientes presente no ambiente natural, principalmente de macronutrientes como o azoto e o fósforo.

Nos sistemas de água doce, o azoto e o fósforo são a fonte de nutrientes de maior limitação ao desenvolvimento das cianobactérias (Mur *et al.*, 1999; Owuor *et al.*, 2007; Wetzel, 1993). As quantidades, proporções e a composição química destes dois nutrientes influenciam a composição, magnitude e a durabilidade dos *blooms* de cianobactérias (Pearl, 2008).

Inicialmente, assumiu-se que as cianobactérias requeriam elevadas concentrações de azoto e fósforo, dada a frequência de *blooms* em lagos eutróficos (ricos em nutrientes). Posteriormente, também se observaram esses *blooms* de cianobactérias quando as concentrações de fósforo dissolvido na água eram baixas. Dados experimentais têm demonstrado uma maior dependência das cianobactérias do azoto e fósforo relativamente a muitos outros organismos fotossintéticos. O desenvolvimento dominante de cianobactérias parece ocorrer preferencialmente a razões baixas das concentrações de azoto e fósforo (10-16N:1P), enquanto as algas eucariotas preferem razões mais elevadas (16-23N:1P) (Mur *et al.*, 1999).

A sobrecarga de nutrientes induz um aumento gradual da produtividade dos lagos, que pode levar à redução significativa das concentrações de nitratos (NO_3^-) e amónio (NH_4^+) na zona trofógena, ou até esgotá-los, devido à assimilação (Wetzel, 1993). O azoto, como componente essencial à produção biológica, é principalmente utilizado na síntese de aminoácidos e proteínas, assim como na síntese de vesículas gasosas. Neste contexto, a limitação de azoto pode influenciar o crescimento celular, particularmente de cianobactérias que não sejam fixadoras de azoto e, simultaneamente, a capacidade de regulação da flutuação exibida por alguns destes microrganismos (Whitton & Potts, 2000). A forma de azoto mais utilizada pelas algas é NO_3^- , uma vez que as concentrações presentes nas águas naturais são superiores às concentrações de NH_4^+ (Wetzel, 1993). As formas de azoto utilizadas pelas cianobactérias são, por ordem preferencial, NH_4^+ , NO_3^- e azoto molecular (N_2) (Whitton & Potts, 2000). Ward & Wetzel (1980), citados por Knappe *et al.* (2004), observaram maiores taxas de crescimento de cianobactérias na presença de NH_4^+ , o que significa que estes organismos necessitam de converter o NO_3^- na forma de azoto mais favorável ao seu desenvolvimento e, por isso, requerem bastante energia. *Blooms* do gênero *Microcystis* spp. têm sido associados a águas com quantidades mínimas de NO_3^- (<20 $\mu\text{g/L}$ em N) e suficientes de NH_4^+ .

As cianobactérias com capacidade de fixar azoto atmosférico, como *Anabaena* spp. e *Aphanizomenon* spp., têm vantagens competitivas sob condições de reduzidas

concentrações de azoto inorgânico na água, apesar da taxa de crescimento ser mais lenta (Mur *et al.*, 1999).

Nos meses de Inverno, há uma maior disponibilidade de azoto inorgânico quando a afluência de NH_4^+ e NO_3^- excede a taxa de absorção de nutrientes pelas algas, coincidente com uma menor actividade do fitoplâncton. Na Primavera, esta actividade aumenta e, por isso, os níveis de azoto inorgânico combinado decrescem. Em águas eutrofizadas, os níveis de azoto são frequentemente muito baixos no epilimnion nos meses de Verão, período em que as cianobactérias fixadoras de azoto atmosférico se desenvolvem em grande número. Todavia, em lagos pouco profundos e em que no fundo os teores em NH_4^+ sejam elevados, durante os meses de Verão, estes teores podem atingir o epilimnion e estimular o desenvolvimento de cianobactérias não fixadoras de azoto atmosférico, como espécies de *Microcystis*. (Knappe *et al.*, 2004).

O fósforo, por sua vez, é de todos os elementos principais o menos abundante para a produtividade biológica. Mais de 90% do teor total em fósforo ocorre sob formas orgânicas nas águas doces. A única forma de fósforo inorgânico solúvel directamente absorvida pelas algas é o ortofosfato (PO_4^{3-}), o qual constitui, nomeadamente, menos de 5% do teor total de fósforo. O ortofosfato é bastante reactivo formando facilmente compostos insolúveis, além de ser facilmente adsorvido por colóides inorgânicos e compostos particulados (argilas e hidróxidos de ferro) (Knappe *et al.*, 2004; Wetzel, 1993). Devido à facilidade que o fosfato possui para co-precipitar com ferro, manganésio e carbonatos, os sedimentos de fundo podem conter elevados teores de fósforo. Se os níveis de oxigénio dissolvido acima da interface água-sedimentos forem reduzidos (< 1mg/L em OD), como resultado da actividade microbiana, as reduções de Fe(III) a Fe^{2+} e de Mn(IV) a Mn^{2+} podem induzir a libertação de fosfato para o hipolimnion. Caso ocorra turbulência na termoclina, o fosfato libertado pode migrar do hipolimnion para o epilimnion, onde pode favorecer o desenvolvimento de algas. As necessidades de fósforo são características de cada espécie e os níveis de fósforo numa massa de água podem determinar as espécies dominantes. As cianobactérias com necessidades elevadas de fósforo são, por exemplo, *Microcystis* spp. e *Oscillatoria* spp..

O ferro e o manganésio constituem dois dos micronutrientes mais importantes para a sobrevivência dos organismos, uma vez que são igualmente necessários para os processos fotossintéticos, a assimilação de nitratos, bem como para outros processos enzimáticos. As cianobactérias fixadoras de azoto atmosférico requerem igualmente a presença de ferro,

podendo coincidir o aumento das quantidades de ferro com o início dos *blooms* (Knappe *et al.*, 2004). Horne & Goldman (1994), citados por Knappe *et al.* (2004), observaram que a depleção dos níveis de ferro dissolvido na água coincidiu com o fim de um *bloom* da espécie *Aphanizomenon flos-aquae*.

Todavia, a concentração de micronutrientes e sua disponibilidade são geralmente suficientes para as necessidades metabólicas dentro das limitações impostas pela luz, temperatura e pela disponibilidade em macronutrientes (Wetzel, 1993).

Vacúolos gasosos

A presença de vacúolos gasosos em muitas cianobactérias planctónicas confere-lhes a capacidade de regular a sua posição vertical na coluna de água mediante as necessidades nutricionais e de luz favoráveis ao seu crescimento (Mur *et al.*; 1999, Knappe *et al.*, 2004; Walsby, 1975). Estas estruturas surgem especialmente em espécies sem mobilidade (Walsby, 1994).

Os vacúolos gasosos são simplesmente agregações de vesículas cilíndricas, cujas extremidades apresentam uma forma cónica (Figura 1.2.1.2.1). O espaço interior destas estruturas é oco e são envolvidas por uma parede ou membrana proteica, fina e contínua.

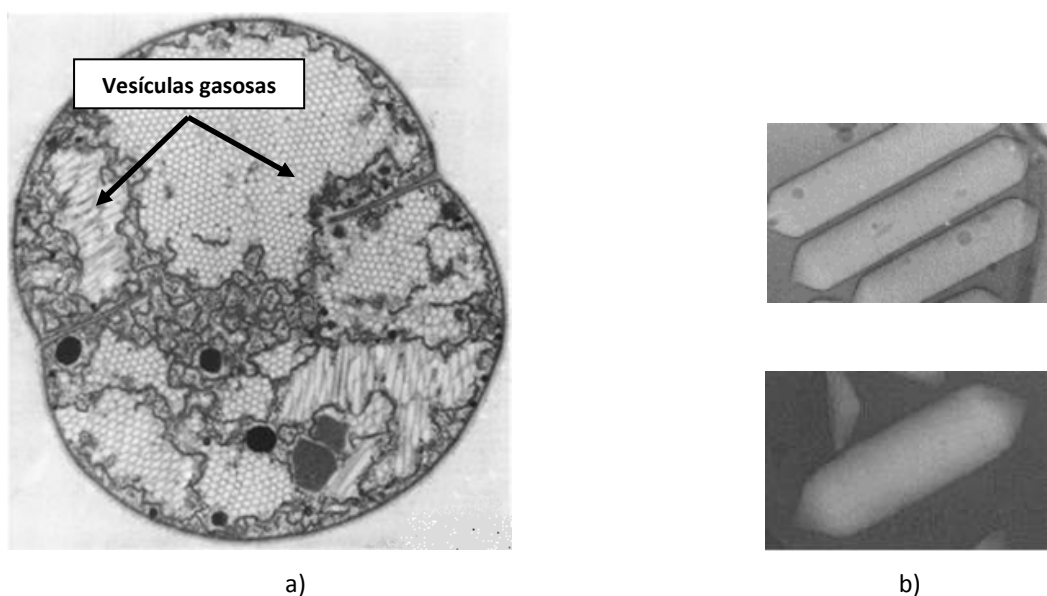


Figura 1.2.1.2. 1 – a) Secção transversal de uma célula cianobacteriana *Microcystis* spp. evidenciando um empilhamento hexagonal de vesículas gasosas (Adaptado de Walsby, 1994); b) Vesículas gasosas da *Anabaena flos-aquae* (imagem direita superior) e da *Halobacterium salinarum* (imagem direita inferior) (Belenky *et al.*, 2004).

Nas cianobactérias, as vesículas gasosas apresentam geralmente um comprimento entre 0,2 µm e 1 µm, um diâmetro de 70 nm a 75 nm (Walsby, 1975; Wolk, 1973) e uma densidade de cerca de 1/10 da densidade da água (Mur *et al.*, 1999). O espaço oco das vesículas é preenchido por gases de difusão, dada a elevada permeabilidade das respectivas membranas a gases como o azoto, oxigénio, dióxido de carbono, hidrogénio e árgon. Deste modo, os gases no interior dos vacúolos são constantes, em equilíbrio dinâmico com o gás dissolvido no citoplasma, mas não significa que todos os gases contidos nas células estejam incorporados nas vesículas gasosas (Walsby, 1975). Klebahn (1925), citado por Wolk (1973), observou que o volume total das suspensões de algas diminuía com o desaparecimento de vacúolos e a alteração na densidade de algas flutuantes era consistente com a substituição de líquido por gás no volume do vacúolo.

Determinadas cianobactérias podem possuir cerca de 10 000 vesículas gasosas numa única célula, dispostas num número reduzido de vacúolos (Walsby, 1975), e podem atingir cerca de 60% a 70% do volume celular (Wolk, 1973).

Apesar das vesículas gasosas possuírem uma estrutura rígida, existe uma *pressão crítica* a partir da qual ocorre o colapso individual das estruturas (Walsby, 1975). A *pressão crítica* é a diferença mínima entre as pressões exterior e interior das vesículas gasosas que provoca o colapso das estruturas (Walsby, 1994). Se o colapso decorre em todas as vesículas gasosas existentes num vacúolo, este desaparece instantaneamente. A perda de flutuabilidade é, assim, consequência da destruição dos vacúolos gasosos por pressão (Walsby, 1975) quando as cianobactérias estão sujeitas a elevadas irradiações (Visser *et al.*, 2005). A *pressão crítica* varia consideravelmente entre as vesículas gasosas existentes numa célula, normalmente entre 200 KPa e 700 KPa (1 atm≈100 KPa), e é inversa à largura das estruturas. A resistência das vesículas gasosas está geralmente associada às condições químicas e físicas que afectam as proteínas constituintes das membranas (Walsby, 1975).

No entanto, o mecanismo da perda de flutuabilidade das cianobactérias, normalmente associada a elevadas intensidades luminosas, depende de cada espécie. Existem cianobactérias que regulam a sua posição vertical na coluna de água através do colapso dos vacúolos gasosos frágeis e outras espécies, com vacúolos gasosos resistentes, através da produção de novas vesículas e de hidratos de carbono densos (não ocorre o colapso de vacúolos) (Knappe *et al.*, 2004; Visser *et al.*, 2005; Walsby, 1994). No primeiro caso, as células expostas a luminosidades mínimas formam vesículas gasosas proporcionando uma

flutuabilidade positiva e, deste modo, ascendem a regiões superiores com mais elevadas intensidades luminosas. O aumento da fotossíntese é acompanhado pelo aumento da produção de açúcares de baixo peso molecular que podem causar uma elevada pressão de turgência no interior da célula. Quando esta pressão excede a *pressão crítica*, algumas das vesículas gasosas colapsam e as cianobactérias sedimentam para regiões onde as intensidades luminosas são mínimas e onde sucede a formação de novas vesículas gasosas (Hoek *et al.*, 1995). No entanto, Utkilen *et al.* (1985), citados por Visser *et al.* (2005), observaram que *Planktothrix* spp. com vesículas gasosas resistentes à pressão de turgência, apresentava um decréscimo no teor de vesículas gasosas celulares para elevadas irradiações, através da diluição das estruturas pelo crescimento (Visser *et al.*, 2005). No terceiro caso, cianobactérias como *Microcystis* spp., perdem a capacidade de flutuação perto da superfície da água devido à produção de hidratos de carbono, durante a fotossíntese. Esta produção contribui para o aumento da densidade celular e, por consequência, provoca a sedimentação das cianobactérias sem ocorrer qualquer colapso das vesículas gasosas (parede constituinte bastante forte). Durante a respiração, os hidratos de carbono são consumidos pelas cianobactérias resultando na diminuição da densidade celular, adquirindo novamente a capacidade de flutuação (Hoek *et al.*, 1995; Knappe *et al.*, 2004). Deste modo, estes microrganismos mantêm sempre uma posição adequada na coluna de água conforme as necessidades de luz, que pode ser excessiva à superfície e demasiado obscura em profundidade, e em nutrientes que, por sua vez, podem ser mais abundantes a maiores profundidades (Knappe *et al.*, 2004). Contudo, a velocidade e a extensão dos movimentos verticais dos microrganismos através da coluna de água são fortemente dependentes do seu tamanho. Como resultado, células individuais ou filamentos de pequenas dimensões movem-se apenas alguns centímetros por dia, enquanto grandes colónias podem se mover 10 metros ou mesmo 100 metros diariamente (Walsby, 1994).

1.2.2 Cianotoxinas

São diversas as razões que tornam as florescências de cianobactérias indesejáveis nos ecossistemas de água doce, sendo talvez a mais preocupante a produção de toxinas naturais conhecidas por cianotoxinas (Premazzi & Volterra, 1993).

No século XIX registou-se o primeiro caso de intoxicação de animais domésticos por cianotoxinas (Austrália), apesar de se suspeitar que ocorrem episódios de intoxicações relacionadas com cianobactérias produtoras de toxinas há mais de 1000 anos (Sivonen & Jones, 1999). Durante a década de 80, intensificaram-se os estudos sobre a ocorrência, distribuição e frequência das cianobactérias, sobretudo pelo impacto económico que as espécies tóxicas vieram a exercer na sociedade, desde intoxicações fatais de animais a acidentes com humanos (Sivonen & Jones, 1999, Premazzi & Volterra, 1993).

As cianotoxinas são metabolitos secundários naturais com um efeito potencialmente tóxico em tecidos, células ou organismos (Carmichael, 1992; Sivonen & Jones, 1999; Premazzi & Volterra, 1993).

Actualmente, os estudos ainda são inconclusivos sobre as razões que levam as cianobactérias a produzirem toxinas, mas alguns resultados indicam que pode consistir num modo de defesa morfológico e fisiológico (Carmichael, 1992) através do contacto físico, associado à alimentação, ou de estímulos químicos (Yang *et al.*, 2006). Alguns estudos têm sido desenvolvidos sobre as respostas morfológicas de cianobactérias produtoras de toxinas perante a presença de possíveis predadores e/ou competidores. Yang *et al.* (2006) investigaram o efeito da predação de diferentes espécies do zooplâncton na indução da defesa morfológica da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Os resultados mostraram que a presença do protozoário flagelado *Ochromonas* spp. induziu a formação de colónias de *M. aeruginosa* (um aumento de 68,7%), enquanto na presença do copépode *Eudiaptomus graciloides*, do cladóceros *Daphnia magna* e do rotífero *Brachionus calyciflorus*, as formas dominantes da população *M. aeruginosa* eram unicelulares e pares de células. Yang *et al.* (2006) sugeriram que a formação de colónias da espécie em causa está provavelmente relacionada com o efeito tóxico das respectivas toxinas (microcistinas) sobre metazoários, isto é, as toxinas da espécie *M. aeruginosa* aparentam não ser suficientemente tóxicas para os flagelados. Estes resultados foram consistentes com outros estudos prévios. Jang *et al.* (2004), por exemplo, observaram um aumento bastante significativo na produção de microcistinas em três estirpes da mesma espécie, até cerca de 50 vezes mais comparativamente às culturas de controlo, especialmente quando são expostas a peixes fitoplanctívoros (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Contudo, factores ambientais, como a temperatura, luz, concentração em azoto e fósforo, disponibilidade de carbono e pH, aparentam igualmente influenciar a produção e

persistência de toxinas. Além dos factores ambientais, a produção destes metabolitos secundários varia entre as diferentes espécies e respectivas estirpes de cianobactérias, provavelmente associada a diferenças genéticas e aos processos metabólicos. Estudos têm mostrado que a produção de toxinas pode variar temporária e espacialmente num mesmo local e que os níveis de toxinas não coincidem necessariamente com o máximo de biomassa de cianobactérias existente (*Cyanobacterial Toxins – Microcystin-LR*, 2009).

Actualmente, as cianotoxinas podem ser classificadas em três grandes grupos, de acordo com o seu mecanismo de toxicidade: neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas. No Homem, estas cianotoxinas podem ser responsáveis por intoxicações agudas ou crónicas, de origem gastrointestinal, respiratória e/ou dermatológica, dependendo da espécie e da forma de entrada (Premazzi & Volterra, 1993). São raros os casos de intoxicações humanas letais, não por serem menos susceptíveis que os animais, mas pelo facto de desagradar às pessoas a ideia de consumir uma água contaminada com *blooms* (Carmichael, 1992).

As neurotoxinas são classificadas estruturalmente como alcalóides, de elevado grau de toxicidade. Estas toxinas actuam ao nível do sistema nervoso, podendo ser letais para animais num curto período de tempo (de alguns minutos a horas), por insuficiência respiratória (Carmichael, 1992; Sivonen & Jones, 1999).

A nível de distribuição mundial, as neurotoxinas são as de ocorrência menos comum. No entanto, a sua presença tem sido registada em águas no Norte de África, Europa e Austrália (Sivonen & Jones, 1999), especialmente usadas para fins recreativos (Falconer & Humpage, 2005). Algumas das espécies produtoras de neurotoxinas já identificadas pertencem aos géneros: *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Oscillatoria* spp. e *Trichodesmium* spp. (Carmichael, 1992; Premazzi & Volterra, 1993). Quatro neurotoxinas foram identificadas até ao momento: anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas. A anatoxina-a tem sido identificada em espécies do género *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp. e *Aphanizomenon* spp., a homoanatoxina-a é produzida pelo género *Oscillatoria* spp., a anatoxina-a(s) é característica do género *Anabaena* spp. e a saxitoxina é produzida pelos géneros *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Lyngbya* spp. e *Cylindrospermopsis* spp..

As hepatotoxinas representam o grupo de toxinas de maior preocupação devido à elevada incidência nos *blooms* de cianobactérias de águas doces e salobras (Premazzi & Volterra, 1993; Sivonen & Jones, 1999) na Europa, América, África e Ásia (Falconer & Humpage, 2005).

As hepatotoxinas incluem as microcistinas e a nodularina, péptidos cíclicos, responsáveis por lesões hepáticas que podem ser letais no caso de intoxicações agudas (hemorragia intra-hepática e choque hipovolémico) e potenciais promotoras de tumores (Carmichael, 1992; Premazzi & Volterra, 1993). Espécies planctónicas dos géneros *Microcystis* spp., *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., *Nodularia* spp. e *Nostoc* spp., são algumas das cianobactérias identificadas como produtoras de hepatotoxinas (Carmichael, 1992; Premazzi & Volterra, 1993; Sivonen & Jones, 1999).

Outra hepatotoxina é a *cylindrospermopsina*, recentemente detectada num episódio de intoxicação humana na Austrália (Falconer & Humpage, 2005). Investigações subsequentes detectaram que esta toxina é produzida pelas espécies *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum* (Premazzi & Volterra, 1993; Sivonen & Jones, 1999), *Raphidiopsis curvata* e *Anabaena bergii* (Wiegand & Pflugmacher, 2005). De acordo com a estrutura química, esta toxina é um alcalóide que, além de afectar o fígado dos animais, pode provocar sintomas patológicos nos rins, baço, timo e no coração.

As dermatotoxinas são toxinas com um menor nível de toxicidade quando comparadas com as toxinas anteriormente mencionadas. Quanto à estrutura química, estas toxinas são lipopolissacarídeos (LPS), existentes na membrana exterior da parede celular das cianobactérias. A componente ácida destas toxinas é responsável por suscitar reacções irritantes e alérgicas nos tecidos humanos e animais após contacto directo. A população humana de maior risco é a dos nadadores que utilizam águas recreativas contaminadas (Premazzi & Volterra, 1993; Sivonen & Jones, 1999).

1.2.2.1 *Microcistinas*

De todas as cianotoxinas identificadas e caracterizadas, as microcistinas representam as toxinas de maior ocorrência em *blooms* tóxicos de cianobactérias dulciaquícolas a nível mundial. De facto, a maioria das ocorrências registadas em Portugal é de microcistinas. Durante a última década, muitos sistemas portugueses de água doce (incluindo lagos, albufeiras e rios por todo o país), utilizados para actividades recreativas e para consumo humano, têm sido assinalados por apresentar *blooms* hepatotóxicos, maioritariamente associados à dominância da espécie *Microcystis aeruginosa* (Vasconcelos, 2006).

A designação destas toxinas deve-se ao facto de terem sido primeiramente isoladas a partir da espécie *Microcystis aeruginosa*, por Bishop *et al.*, em 1959 (Charmichael, 1992). Posteriormente, foram identificados outros géneros de cianobactérias planctónicas, também produtores de microcistinas, tais como: *Anabaena* spp., *Oscillatoria (Planktothrix)* spp., *Nostoc* spp. e *Anabaenopsis* spp. (Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas são heptapéptidos monocíclicos (cadeia cíclica com sete aminoácidos), com dois aminoácidos específicos, o ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) e o Mdha (*N*-methyldehydroalanine), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y) (Figura 1.2.2.1.1a). As diferentes posições assumidas por estes dois últimos aminoácidos contribuem para a existência de uma vasta gama de variantes de microcistinas, cerca de 71 variantes até à data (Codd *et al.*, 2005). Das diferentes variantes caracterizadas, a variante microcistina-LR (Figura 1.2.2.1.1b) é a mais comum e a mais tóxica, constituída pela leucina na posição 2 e arginina na posição 4 (Carmichael, 1992; Sivonen & Jones, 1999), seguida da microcistina-RR (arginina; arginina) e da microcistina-YR (tirosina; arginina) (Falconer & Humpage, 2005).

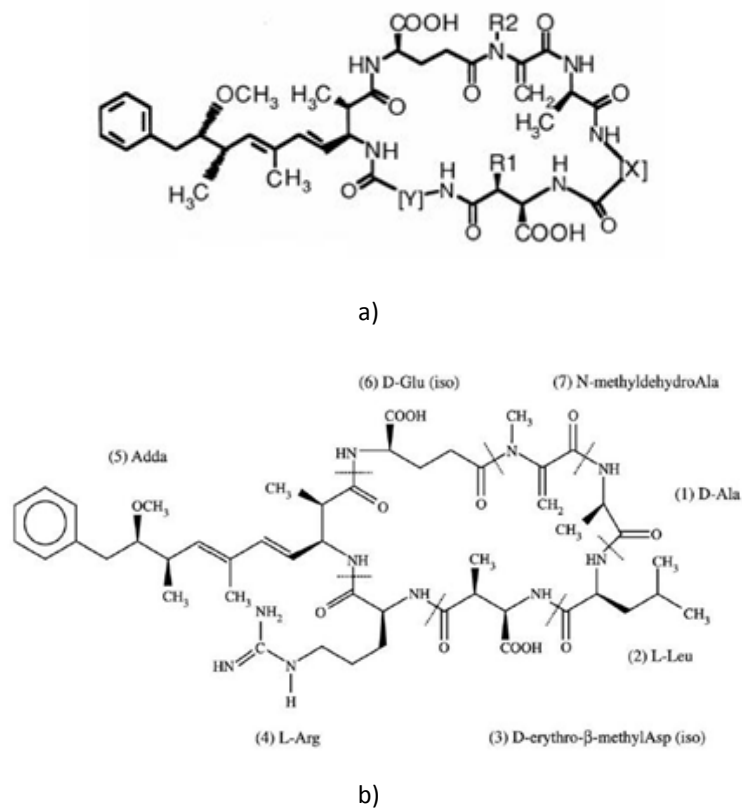


Figura 1.2.2.1. 1 – Estrutura química a) básica das microcistinas (Adaptado de Falconer & Humpage, 2005) e da b)microcistina-LR (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

A hepatotoxicidade das microcistinas é devida, em grande parte, ao aminoácido ADDA, uma vez que a sua remoção ou saturação reduzem substancialmente a toxicidade das microcistinas (Carmichael, 1992; Sivonen & Jones, 1999; Wiegand & Pflugmacher, 2005).

As microcistinas, como péptidos cíclicos, são extremamente estáveis, solúveis na água e resistentes a temperaturas elevadas (Falconer & Humpage, 2005) e à hidrólise ou oxidação química para valores de pH próximos do neutro. A biodegradação das microcistinas é muito lenta (semanas), dependendo da radiação solar, concentração inicial de microcistinas e de outros factores ambientais (concentração em carbono orgânico dissolvido, por exemplo). Desta forma, as microcistinas dissolvidas podem persistir por meses ou anos numa massa de água. Todavia, estas cianotoxinas são susceptíveis à degradação por algumas bactérias naturais de rios e albufeiras (Christoffersen *et al.*, 2002; Sivonen & Jones, 1999; King, 2001).

Pesquisas sobre a produção de microcistinas têm sido concordantes em que a quantidade de toxinas aumenta na fase logarítmica do crescimento e é máxima na fase de senescência, principalmente devido à lise e morte das células.

Além da síntese de toxinas constituir uma característica de cada estirpe, alguns factores ambientais podem afectar os respectivos teores celulares. Diversos estudos indicaram que a síntese de microcistinas é influenciada pela intensidade luminosa e pela qualidade da luz. A produção de microcistinas é maior sob condições de luminosidade favoráveis ao crescimento das estirpes (Sivonen & Jones, 1999), mas a partir de uma determinada radiação esta pode ser limitante. A luz vermelha aparenta ser a mais favorável ao processo, ao contrário da luz azul (Figueiredo *et al.*, 2004). No entanto, estudos recentes demonstraram que a intensidade luminosa exerce um efeito insignificante, ou mesmo nulo, no teor em microcistinas celulares e que as diferenças entre a toxicidade de *blooms* de uma mesma espécie são principalmente devidas às taxas de crescimento e às características das diferentes estirpes.

A temperatura pode influenciar, para além do teor em microcistinas (Premazzi & Volterra, 1993), o tipo de toxina produzida. Para temperaturas elevadas (acima de 25°C), há um aumento da produção da microcistina-RR enquanto temperaturas mais baixas favorecem a síntese de microcistina-LR (Figueiredo *et al.*, 2004). Um estudo laboratorial com a espécie *Microcystis aeruginosa* demonstrou que as células eram mais tóxicas na fase tardia do crescimento quando sujeitas a uma temperatura de 20 °C, sendo a toxicidade nitidamente reduzida para temperaturas superiores a 28 °C (Premazzi & Volterra, 1993).

O estudo da correlação entre a toxicidade das células e as condições nutricionais óptimas ao desenvolvimento das cianobactérias é muitas vezes contraditório. Kotak *et al.* (1995), citados por Kamoge & Hirooka (2000), observaram, num lago hipereutrófico do Canadá, uma correlação positiva entre a concentração de microcistina-LR com a dominância da espécie *Microcystis aeruginosa* e com a concentração de fósforo e, no entanto, uma correlação negativa com a concentração de azoto. Esta relação entre produção de toxinas e concentrações elevadas de fósforo está em concordância com diversos estudos laboratoriais (Sivonen & Jones, 1999). Porém, em águas eutróficas da África do Sul, Wicks & Thiel (1990) verificaram que a produção de microcistinas apresentava uma correlação negativa com a concentração de fósforo solúvel (citados por Kamoge & Hirooka, 2000), em concordância com Oh *et al.* (2000) que documentaram valores elevados de teor em microcistinas, na espécie *Microcystis aeruginosa*, sob condições limitantes de fósforo (citados por Figueiredo *et al.*, 2004). No entanto, Utkilen & Gjølme (1995), citados por Sivonen & Jones (1999), constataram, em culturas contínuas de *Microcystis aeruginosa*, que a produção de toxinas não é afectada por condições limitantes de fósforo, para além de azoto.

De acordo com Sivonen & Jones (1999), as espécies não fixadoras de azoto atmosférico, como *Microcystis* spp. e *Oscillatoria* spp., produzem toxinas em maior quantidade em condições de abundância de azoto.

Os resultados relativos aos efeitos das concentrações de azoto e fósforo são de facto bastante controversos, mas a produção de microcistinas por estirpes de *Microcystis* spp. aparenta ser influenciada pela variação das concentrações dos nutrientes com respostas diferentes dependendo da estirpe considerada (Vézie *et al.*, 2002, citados por Figueiredo *et al.*, 2004).

Resultados contraditórios também se averiguam nas concentrações de ferro. Aegerter (1993), citado por Figueiredo *et al.* (2004), apurou que a síntese de microcistinas na espécie *Microcystis aeruginosa* aumenta com a concentração de ferro enquanto o crescimento diminui. Utkilen & Gjølme (1995) verificaram, numa estirpe diferente, uma relação linear entre a produção de microcistinas e a concentração de ferro (Figueiredo *et al.*, 2004).

Contudo, Orr & Jones (1998), citados por Sivonen & Jones (1999), demonstraram que a taxa de produção de microcistinas por uma população de cianobactérias em cultura é directamente proporcional à respectiva taxa de crescimento, independentemente de algum factor ambiental ser limitante. Além disso, os mesmos autores mostraram que o teor em

microcistinas contido em cada célula, da espécie *Microcystis aeruginosa*, se mantinha relativamente constante dentro de um intervalo estreito de tempo.

A atenção especial dada às microcistinas não se deve apenas à aptidão que exibem em causar intoxicações agudas, mas também devido ao potencial efeito promotor cancerígeno (carcinoma hepático) através da exposição crónica de humanos a baixas concentrações de microcistinas presentes na água potável (Charmichael, 1992), em lagos e rios recreativos (menor exposição) e/ou em suplementos alimentares cuja composição inclui algas (Sivonen & Jones, 1999). Na China, a incidência da patologia, oito vezes maior, foi relacionada com a ingestão de água e comida contaminadas com microcistinas (Codd *et al.*, 2005).

O factor bioacumulativo de microcistinas por alguns organismos aquáticos é igualmente uma preocupação para a saúde pública. Diversos estudos toxicológicos têm demonstrado o perigo da bioacumulação de microcistinas por invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo peixes que estão inseridos na cadeia alimentar humana (Charmichael, 1992). Li *et al.* (2004), por exemplo, observaram a bioacumulação da microcistina-LR em carpas (*Cyprinus carpio*). Segundo estes autores, as microcistinas podem ser parcialmente excretadas pelas fezes após a biotransformação e as restantes toxinas são acumuladas no fígado, músculos e em outros tecidos das carpas.

As intoxicações com microcistinas podem ser resumidas por sintomas como gastroenterites, diarreias, náuseas, cólicas abdominais e epigástricas, febre, hepatites com anorexia, astenia e hepatomegalia, distúrbios respiratórios e alérgicos e a morte (Premazzi e Volterra, 1993).

Como consequência da frequência e toxicidade das microcistinas nos *blooms* de cianobactérias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um valor máximo admissível (VMA) para a concentração de microcistinas de 1 µg/L, expressa em equivalentes de microcistina-LR, em águas para consumo humano (Falconer *et al.*, 1999). No entanto, alguns países propuseram outros valores para a concentração de microcistinas, nomeadamente 1,5 µg/L no Canadá e 1,3 µg/L a 10 µg/L na Austrália (King, 2001).

1.2.2.2 Casos de intoxicação relacionados com toxinas de cianobactérias

Intoxicações com toxinas de cianobactérias têm ocorrido em lagos artificiais e naturais e em albufeiras por todo o mundo.

Episódios de mortalidade têm sido registados desde inícios do século XIX, sobretudo em animais domésticos. Em termos de mortalidades humanas os registos são escassos.

Casos de Intoxicações com animais

As primeiras publicações sobre mortalidades de animais domésticos e aves após consumo de água com *blooms* ou escumas surgiram na Dinamarca (1833), Austrália (1878) e Polónia (1884).

De entre os animais domésticos afectados por *blooms* de cianobactérias incluem-se porcos, cavalos, búfalos, ovelhas, cães, gatos e aves domésticas (galinhas, patos, entre outras). Mortalidades de animais selvagens têm afectado veados, rãs, salamandras, doninhas fedorentas, esquilos, morcegos, girafas, zebras, entre muitos outros animais. A maioria das intoxicações ocorre por via oral. No caso de mortalidades de animais selvagens de níveis tróficos mais elevados, é possível que a exposição às toxinas de cianobactérias possa suceder através da cadeia alimentar (Codd *et al.*, 2005).

Nos Quadros 1.2.2.2.1 e 1.2.2.2.2 são apresentados exemplos de intoxicações letais de animais com cianobactérias tóxicas.

Quadro 1.2.2.2. 1 – Exemplos de casos letais de animais por ingestão de cianobactérias (Adaptado de Codd *et al.*, 2005).

País	Cianobactérias	Mortes	Referências
Dinamarca	Sem identificação	Bovinos, peixes	Hald, 1833
Austrália	<i>Nodularia spumigena</i>	Ovinos, bovinos, cavalos, porcos, cães	Francis, 1878
Polónia	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena flosaquae</i> , « <i>Limnochlode flosaquae</i> » (<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>)	Potros, patos, galinhas, pombos, peixes	Benecke, 1884

Quadro 1.2.2.2. 2 – Mortalidade massiva de espécies de flamingos após a ingestão ou exposição a cianobactérias (Adaptado de Codd *et al.*, 2005).

Localização	Espécie de flamingo	Número de mortes	Cianobactérias	Referências
Estados Unidos da América	<i>P. chilensis</i>	10	<i>Microcystis</i>	Chittick <i>et al.</i> , 2002
Espanha	<i>P. ruber</i>	579	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>	Alonso-Andicoberry <i>et al.</i> , 2002
Quénia	<i>P. minor</i>	Dezenas de milhar	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i>	Ballot <i>et al.</i> , 2002 e Krienitz <i>et al.</i> , 2003

Casos de intoxicações humanas

Nos últimos 25 anos surgiu um número reduzido de publicações sobre patologias humanas e óbitos associados à exposição a células e toxinas de cianobactérias (Quadro 1.2.2.2.3).

Quadro 1.2.2.2. 3 – Exemplos de patologias humanas associadas à exposição a cianobactérias (Adaptado de Codd *et al.*, 2005).

Ano	Localização	Cianobactérias	Patologias	Referências
Consumo de água				
1931	Estados Unidos da América	<i>Microcystis</i>	Não identificadas	Tisdale, 1931
1968	Estados Unidos da América	Não identificadas	Doenças gastrointestinais	Schwimmer e Schwimmer, 1968
1975	Estados Unidos da América	<i>Schizothrix</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Phormidium</i>	Gastroenterites	Lippy e Erb, 1976 e Keleti, 1981
1979	Austrália	<i>Cylindrospermo-opsis</i>	Gastroenterites, danos hepáticos, danos renais, danos intestinais	Byth, 1980 e Griffiths <i>et al.</i> , 1998
1981	Austrália	<i>Microcystis</i>	Danos hepáticos	Falconer <i>et al.</i> , 1983
1972 - 1990	China	<i>Microcystis</i>	Cancros hepáticos, morte	Yu, 1989, 1995
1988	Brasil	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	Gastroenterites, morte	Teixeira <i>et al.</i> , 1993
1994	Suécia	<i>Planktothrix</i>	Gastroenterites, febres, dores abdominais e musculares	Annadotter <i>et al.</i> , 2001
Contacto ocupacional ou recreativo com água				
1959	Canadá	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	Cefaleias, náuseas, dores musculares, diarreia	Dillenberg e Dehnel, 1960
1989	Reino Unido	<i>Microcystis</i>	Gastroenterites, garganta inflamada, febres, vômitos, dores abdominais, pneumonia	Turner <i>et al.</i> , 1990
1995	Austrália	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Nodularia</i>	Gastroenterites, sintomas gripais, febres, irritações nos olhos e/ou, ouvidos, úlceras bocais	Pilotto <i>et al.</i> , 1997
1996	Reino Unido	<i>Planktothrix</i>	Erupções cutâneas, febres	G.A. Codd e K. A. Beattie, Relatório da agência ambiental
1996 - 1998	Austrália	<i>Lyngbya</i>	Dermatite de contacto, erupções cutâneas, irritação respiratória	Dennison <i>et al.</i> , 1999
Hemodiálise				
1974	Estados Unidos da América	Não identificadas	Febres, mialgias, arrepios, vômitos	Hindman <i>et al.</i> , 1975
1996	Brasil	<i>Microcystis</i>	Distúrbios visuais, náuseas, vômitos, danos hepáticos, morte	Jochimsen <i>et al.</i> , 1998; Pouria <i>et al.</i> , 1998; Carmichael <i>et al.</i> , 2001 e Azevedo <i>et al.</i> , 2002
2001	Brasil	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i>	Distúrbios visuais, náuseas, vômitos, danos hepáticos	Carmichael <i>et al.</i> , 2002

1.3 ULTRA-SONS COMO TECNOLOGIA DE TRATAMENTO DE BLOOMS

Os ultra-sons apresentam uma vasta gama de aplicações na ciência, medicina e indústria (Mason & Lorimer, 2002).

Nos últimos anos tem-se assistido a um interesse crescente por parte de cientistas sobre a promissora tecnologia ultra-sónica na protecção do ambiente. Em 2006, no 10º Encontro da Sociedade Europeia de Sonoquímica (European Society of Sonochemistry – ESS), ocorrido na Alemanha, foram delineados alguns desenvolvimentos e perspectivas futuras da utilização da energia ultra-sónica na remediação e prevenção da poluição ambiental. Neste contexto, a sonoquímica surgiu como ciência de elevado interesse na área ambiental, sendo designada por *green chemistry* (Mason, 2007b).

A remediação biológica e química de águas contaminadas, a descontaminação atmosférica e a remediação de solos contaminados são alguns exemplos de possíveis aplicações da sonoquímica (Mason *et al.*, 2003, 2007a). Algumas pesquisas sobre a conjugação da radiação ultra-sónica com alguns processos unitários em estações de tratamento de água (ETA) apresentaram resultados interessantes, nomeadamente na coagulação para a remoção efectiva de algas (Heng *et al.*, 2009) e, sobretudo, na desinfecção com cloro (Mason, 2007a), ozono e radiação ultra-violeta (Mason & Pétrier, 2004).

À escala industrial, o tratamento de lamas produzidas nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) através de ultra-sons é já uma realidade em 40 ETAR distribuídas mundialmente (Romero, 2007). Segundo Romero, 2007, existem grandes expectativas para a implementação de desintegradores ultra-sónicos de matéria orgânica (DUMO) em Portugal.

No presente trabalho são abordados os efeitos químicos e físicos da tecnologia ultra-sónica quando aplicada num meio líquido.

1.3.1 Definição e mecanismo da sonicação

Os ultra-sons são definidos como sons de frequência superior a 16 KHz e, por isso, imperceptíveis à audição humana.

Na prática, a aplicação ultra-sónica divide-se em três áreas distintas: alta frequência ou ultra-sons de diagnóstico (2 MHz a 10 MHz); baixa frequência ou potência ultra-sónica

convencional (20 KHz a 100 KHz) (Mason & Lorimer, 2002; Ince *et al.*, 2001); e frequência intermédia ou ultra-sons de “efeitos sonoquímicos” (300 KHz a 1000 KHz). Nesta última categoria são geradas condições extremas de temperatura e de pressão através da formação, crescimento e colapso de bolhas cavitacionais (Ince *et al.*, 2001).

Os ultra-sons são ondas sonoras que se propagam em ciclos sucessivos de compressão e rarefacção através do meio irradiado (Mason & Pétrier, 2004), conduzidos pela variação de pressão (Tang, 2004).

Para uma potência suficientemente elevada, o ciclo de rarefacção pode exceder as forças atractivas das moléculas presentes em meio líquido, originando uma infinidade de bolhas cavitacionais micrométricas (Mason & Pétrier, 2004; Romero, 2007). Estas bolhas aumentam o seu diâmetro por difusão (Mason & Pétrier, 2004) que consiste na introdução de pequenas quantidades de vapor (ou gás) do meio circundante para o interior das bolhas, durante a fase de expansão (rarefacção, ou pressão negativa), não sendo totalmente expelidas na fase de compressão. Nesta fase, tal como o nome indica, as bolhas gasosas expandidas são comprimidas, devida à pressão externa mais elevada. Desta forma, as fases alternadas de rarefacção e compressão induzem um aumento crescente no tamanho das bolhas, durante um curto período de ciclos, até se estabelecer um equilíbrio com a frequência aplicada. É nesta fase crítica de equilíbrio que ocorre o colapso das bolhas cavitacionais, decorrente num ciclo de compressão. Uma quantidade de energia substancial é expulsa para o meio irradiado, aquando da implosão das bolhas cavitacionais, dando origem a eventuais efeitos químicos e mecânicos (Mason & Pétrier, 2004; Romero, 2007). Este fenómeno físico de geração e subsequente destruição de bolhas cavitacionais é conhecido por cavitação ultra-sónica (Figura 1.3.1.1) (Ince *et al.*, 2001; Mason & Pétrier, 2004).

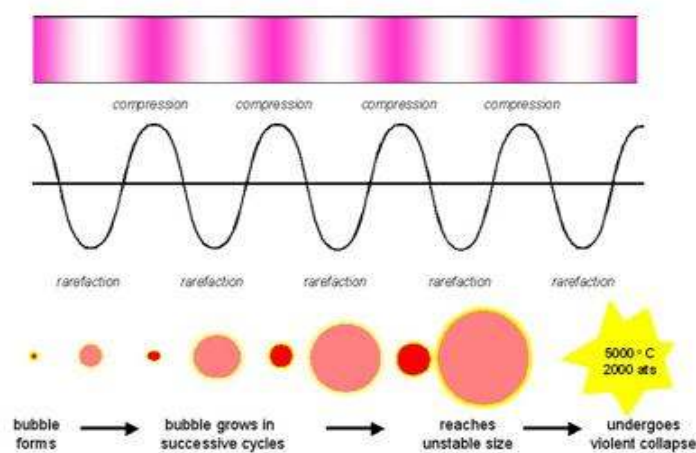


Figura 1.3.1.1 – Cavitação acústica (Mason & Pétrier, 2004).

A energia produzida pela cavitação acústica está associada a elevadas temperaturas e pressões no gás das bolhas que podem atingir valores tão altos como 5000 °C e 500 atm, respectivamente (Romero, 2007; Tang, 2004). Segundo Mason & Pétrier, 2004, em sistemas aquosos, para uma frequência de 20 KHz, cada colapso de bolhas cavitacionais actua como um “hotspot” localizado, gerando temperaturas de cerca de 4000 °K e pressões superiores a 1000 atm.

A origem dos efeitos químicos resultantes da acção ultra-sónica numa água cinge-se, principalmente, a reacções oxidativas com a produção primária de radicais livres de hidrogénio (H^\bullet) e de hidróxidos (OH^\bullet), processo designado por sonólise. A energia térmica gerada durante a cavitação constitui a base para a cisão homolítica das ligações químicas H-O (Mason & Pétrier, 2004). Os radicais livres, de elevada reactividade, interagem com iões ou moléculas, ou associam-se. Esta rápida interacção induz a consequente produção de novas espécies moleculares, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), novos radicais livres (HO_2^\bullet) ou, ainda, oxigénio gasoso (O_2) (Mason, 1997). Na Figura 1.3.1.2 é apresentada a decomposição da água impelida por sonólise e as reacções subsequentes.

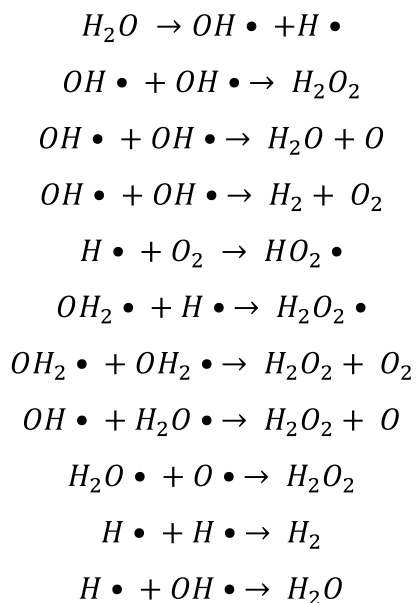


Figura 1.3.1. 2 – Processos oxidativos numa água induzidos pela aplicação de ultra-sons (Adaptado de Mason & Pétrier, 2004).

Qualquer espécie dissolvida na água é distintamente sujeita a reacções químicas com os radicais livres produzidos pelos ultra-sons (Mason & Pétrier, 2004). A título de exemplo, o azoto molecular (N_2) e o oxigénio molecular (O_2) dissolvidos numa água, sob condições

causadas pela cavitação acústica, podem reagir entre si para formar óxido nítrico (NO). O NO é posteriormente oxidado a dióxido de azoto (NO₂) que, por sua vez, se combina com moléculas de água formando ácido nítrico (HNO₃) e ácido nitroso (HNO₂) (Tang *et al.*, 2004). Dois componentes essenciais a considerar para o processo de cavitação são o meio líquido e a fonte de vibrações de elevada energia, os transdutores (convertem a energia eléctrica ou mecânica em energia sonora). À escala laboratorial, os dois geradores de cavitação acústica mais utilizados são o banho ultra-sónico e a sonda ultra-sónica (*probe*) (Mason, 1997; Mason & Pétrier, 2004). O sistema de banho ultra-sónico inclui normalmente um ou mais transdutores piezoeléctricos na parte inferior do aparelho e a energia ultra-sónica é transmitida através de um meio líquido, com a consequente dispersão de energia (Figura 1.3.1.3a). O segundo gerador é um sistema mais eficiente. A sonda ultra-sónica é fixa na extremidade do amplificador do transdutor e directamente imersa no meio reaccional (Mason, 1997; Mason & Pétrier, 2004). Em termos de potência, este sistema apresenta um desempenho 100 vezes melhor comparativamente ao sistema de banho ultra-sónico (Figura 1.3.1.3b) (Santos & Capelo, 2007).

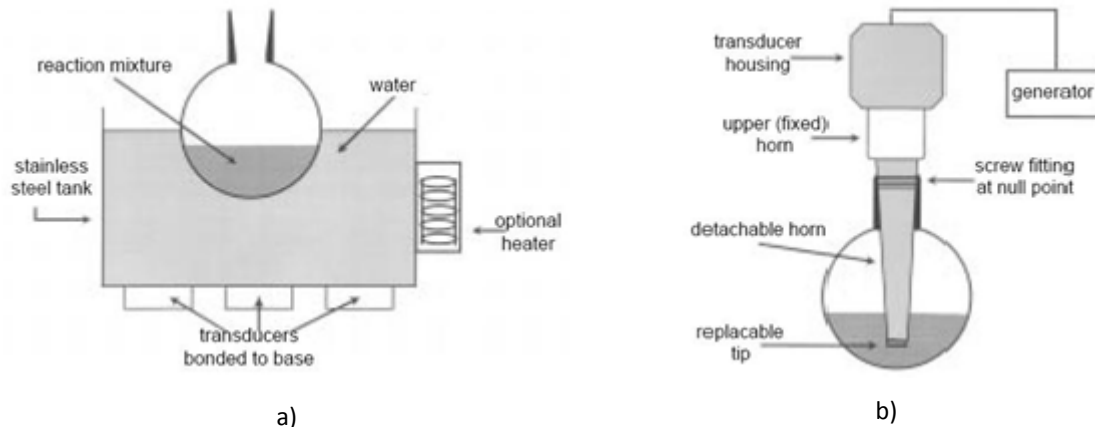


Figura 1.3.1. 3 – Equipamentos de laboratório de ultra-sons: a) Banho de ultra-sons e b) Sonda ultra-sónica (Adaptado de Mason, 1997).

Todavia, para a condução de reacções através de ondas ultra-sónicas é fundamental controlar parâmetros como a frequência, potência ou amplitude e o tempo de exposição (Ince *et al.*, 2001; Mason, 2007a).

1.3.2 Efeitos da irradiação ultra-sónica nas cianobactérias

O controlo de *blooms* de cianobactérias continua a ser uma das maiores preocupações mundiais. As estratégias actuais de controlo para inibir o desenvolvimento de cianobactérias incluem a utilização de químicos, como o sulfato de cobre e o hipoclorito de cálcio. Porém, o tratamento químico pode não só induzir outro tipo de poluição (poluentes secundários), mas também aumentar a concentração de microcistinas dissolvidas na água (Lam *et al.*, 1995).

Alguns estudos recentes apontam a tecnologia ultra-sónica como um método eficiente e mais rápido de controlo de *blooms* de cianobactérias. O principal mecanismo na origem deste controlo consiste na limitação da capacidade de flutuação dos organismos, atenuando a sua concentração próxima da superfície da água, assim como o seu crescimento e sobrevivência (Chi *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2005; Mahvi & Dehgani, 2005; Tang *et al.*, 2004). Além deste efeito, os ultra-sons podem ainda inibir ou reduzir o crescimento das populações de algas pela sua interferência nos processos metabólicos (Chi *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005). No entanto, os parâmetros ultra-sónicos a considerar são ainda imprecisos, pois depende do sistema de ultra-sons disponível e também das espécies submetidas ao tratamento.

Pesquisas já realizadas demonstraram que a irradiação ultra-sónica é efectiva na inibição do crescimento de cianobactérias possuidoras de vacúolos gasosos, atribuída ao colapso destes organelos celulares. À escala laboratorial, Lee *et al.* (2001) investigaram os primeiros efeitos da irradiação ultra-sónica sobre espécies de cianobactérias, *Microcystis viridis* e *Microcystis aeruginosa*, e os respectivos factores que afectam a sua sedimentação. Concluíram que a irradiação ultra-sónica (sistema banho de ultra-sons), para uma potência de 120 W e uma frequência baixa de 28 KHz, induzia o colapso dos vacúolos gasosos das cianobactérias e a sua consequente sedimentação, quando submetidas a um curto período de exposição de 30 s. Similarmente, Mahvi & Dehgani (2005), para o mesmo período de tempo num sistema de banho de ultra-sons (70 W e 42 KHz), verificaram uma redução significativa da população de algas (não identificadas), podendo atingir os 100% para um tempo de contacto de 150 s. Não obstante, Lee *et al.* (2001) verificaram que, para uma potência de 40 W combinada com uma menor frequência, de 21,5 KHz, os efeitos ultra-sónicos eram ainda maiores. Adicionalmente à sedimentação das células, a irradiação ultra-sónica infligiu danos imediatos na actividade fotossintética, com poucas hipóteses de recuperação para uma

potência de 1200 W, uma frequência de 28 KHz e um tempo de exposição de 2 minutos. Outro factor averiguado pelos autores consistiu na ausência de uma eventual libertação de toxinas para o meio solúvel, para um tempo de exposição de 5 minutos.

Chi *et al* (2003), em desacordo com a atribuição ao colapso dos vacúolos gasosos do principal efeito ultra-sónico na inibição do crescimento das cianobactérias, testaram outros possíveis mecanismos inibitórios na espécie *Microcystis aeruginosa*. A potência e frequência utilizadas foram 600 W e 20 KHz, respectivamente, através de uma sonda ultra-sónica. As culturas foram submetidas aos ultra-sons durante 6 dias e analisadas até completarem 16 dias. Após a interrupção da sonicação, os investigadores observaram uma restrição temporária do crescimento da espécie, suportada por uma maior dimensão das células sonicadas e por elevadas concentrações de clorofila *a*, apesar destes dois factores terem decrescido em simultâneo com a interrupção dos ultra-sons. Um mecanismo inibitório igualmente considerado foi a formação de radicais livres, proporcional ao aumento da duração da irradiação ultra-sónica. Estas espécies oxidantes são possivelmente responsáveis pela destruição de células através da inibição da fotossíntese, de danos nas membranas e da peroxidação lipídica. Porém, os autores não inferiram qualquer influência significativa dos radicais livres na inibição do crescimento da espécie, provavelmente atribuída a mecanismos de defesa das células, nomeadamente actividades antioxidantes exibidas pelas ficobiliproteínas. Outro factor ponderado foi o período ideal de submissão das culturas aos ultra-sons, sugerindo que esta deve ser executada imediatamente após a divisão celular (no final da fase luminosa) para o controlo de *blooms* de espécies *Microcystis aeruginosa*. De forma a compreenderem os efeitos dos ultra-sons nos parâmetros de qualidade da água, Chi *et al.* (2003) construíram um microcosmos cilíndrico de plástico, num lago eutrófico da Coreia, com uma capacidade de 200 L, e utilizaram um gerador de ultra-sons operacional a 630 W e 22 KHz. Os parâmetros analisados foram a temperatura, oxigénio dissolvido, clorofila *a* e as quantidades de fósforo e azoto totais, dissolvidas e particuladas. Os resultados mostraram que a acção ultra-sónica provocou um incremento na temperatura da água, ao contrário dos parâmetros pH e oxigénio dissolvido, baixas taxas fotossintéticas e supressão no crescimento das cianobactérias. Chi *et al.* (2003) obtiveram também um decréscimo significativo na concentração de clorofila *a*, assim como nas concentrações totais de azoto e fósforo. Estes resultados foram associados à rápida sedimentação das células, resultante da ruptura dos vacúolos gasosos constituintes. As concentrações totais de fósforo

e azoto particulados sofreram uma redução mais ligeira, correlacionada com uma proliferação inicial de cianobactérias na experiência controlo. Por outro lado, elevadas concentrações totais de fósforo e de ortofosfatos inorgânicos dissolvidos foram atribuídas aos efeitos ultra-sónicos ao induzirem a dissolução e dissociação de fosfatos adsorvidos a partículas. A concentração total de azoto dissolvido manteve-se constante, uma vez que as principais formas de azoto (amónia, nitrato e nitrito), no geral, não se encontram adsorvidas a partículas orgânicas e inorgânicas. Antecedendo esta experiência, Lee *et al.* (2002) aplicaram igualmente a irradiação ultra-sónica num lago eutrófico do Japão e monitorizaram a qualidade da água durante dois anos. Dez sistemas de ultra-sons e bombas de jactos de água foram instalados por todo o lago, obtendo melhorias em termos de turvação, sólidos suspensos, carência química de oxigénio, teores totais de fósforo e ainda, mas pouco significativas, de clorofila *a*. Todavia, os efeitos dos ultra-sons dificilmente se detectaram. O decréscimo de fósforo total, por exemplo, pode ser explicado pelo melhoramento da circulação e arejamento da água. A fraca redução da clorofila *a* pode ter sido devida à baixa potência do gerador de ultra-sons (100 W) associada a uma alta frequência (200 KHz). Os efeitos sobre o controlo de *blooms* foram mínimos pois as cianobactérias recuperaram rapidamente a sua capacidade de flutuação e retomaram o seu crescimento activo mesmo após sedimentação no fundo do lago.

Tang *et al.* (2004) verificaram respostas diferentes de duas espécies de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa*, possuidora de vacúolos gasosos, e *Synechococcus* PCC 7942, isenta de vacúolos gasosos, quando expostas à irradiação ultra-sónica. Os parâmetros ultra-sónicos utilizados num banho de ultra-sons foram 1,7 MHz de frequência, 0,6 W/cm² de intensidade ultra-sónica e um tempo de contacto de cinco minutos. As amostras foram submetidas à irradiação ultra-sónica diariamente durante quatro dias. Em concordância com a pesquisa de Lee *et al.* (2001), Tang *et al.* (2004) verificaram um decréscimo no desenvolvimento da espécie *Microcystis aeruginosa* de aproximadamente 65%, mas o tempo de uma nova geração aumentou para o dobro, tanto como na amostra controlo. Relativamente à cultura de *Synechococcus*, esta espécie apresentou um crescimento tão rápido como o verificado na amostra controlo. Estas observações foram complementadas com a determinação da condutividade eléctrica, indicadora de cavitação acústica, do teor em *malondialdehyde* (MDA), indicador de peroxidação lipídica, e da permeabilidade das membranas. Perante estes resultados, a importância ou influência do efeito cavitacional dos ultra-sons aparenta

ter maior impacto nas cianobactérias detentoras de vacúolos gasosos. De salientar que a verificação por estes autores da existência da peroxidação lipídica em *Microcystis aeruginosa* contrariou a observação do estudo elaborado por Chi *et al.* (2003), anteriormente referido, que apresentaram a ruptura dos vacúolos gasosos como sendo responsável pela sedimentação das células.

Outra abordagem mais recente, com a espécie *Microcystis aeruginosa*, demonstrou que a sonicação, através de uma sonda ultra-sônica, reduz ligeiramente a concentração de células (densidade celular) e a concentração de microcistinas extracelulares, em termos imediatos. A longo prazo, a acção ultra-sônica inibiu efectivamente o crescimento celular e a libertação de microcistinas para o meio solúvel, 14 dias após irradiação ultra-sônica. Estes resultados foram obtidos para uma potência de 80 W, uma frequência de 25 KHz e um tempo de exposição de cinco minutos. A atenuação do crescimento da *M. aeruginosa* coincidiu com o decréscimo da concentração de clorofila *a* (21,3%), da absorvância de ficocianinas (44,8%) e da taxa de evolução de oxigénio (40,5%) (Zhang *et al.*, 2006a).

Ma *et al.* (2005) estudaram a influência do campo ultra-sónico sobre a produção de microcistinas do género *Microcystis* spp.. Para compreenderem o impacto exercido pela frequência e potência, os autores utilizaram três sistemas de banho (150 KHz, 410 KHz e 1,7 MHz) e um sistema de sonda (20 KHz) com diferentes potências (30 W, 60 W e 90 W). Em concordância com Lee *et al.* (2001), Ma *et al.* (2005) verificaram que, até cinco minutos de exposição, as concentrações de microcistinas dissolvidas se mantiveram, sugerindo uma provável degradação das microcistinas libertadas para o meio solúvel, uma vez que as células *Microcystis* foram fragmentadas. A eventual decomposição das microcistinas foi mais eficiente para uma frequência de 150 KHz (potência constante de 30 W) com uma redução de 70,6% comparativamente à amostra controlo. Piores resultados foram obtidos para a frequência mais baixa (20 KHz) e para a frequência mais alta (1,7 MHz). Em termos de potência, Ma *et al.* (2005) concluíram que a potência mais elevada, de 90 W, induz uma degradação mais rápida das microcistinas dissolvidas (63,6%). Estes resultados sugeriram que as frequências intermédias e as potências mais altas exercem melhores efeitos na inibição do crescimento das cianobactérias e na degradação de microcistinas para um tempo de exposição até cinco minutos (Ma *et al.*, 2005).

Zhang *et al.* (2006b), além de avaliarem o impacto dos ultra-sons na remoção de algas, investigaram também uma correlação entre os parâmetros ultra-sónicos com vista à

minimização da libertação de toxinas aquando da lise celular induzida pelos ultra-sons. Com suspensões da mesma espécie, *Microcystis aeruginosa*, concluíram que os efeitos resultantes da aplicação da sonicação nos diferentes estágios de crescimento são semelhantes. Os mesmos autores verificaram ainda que a remoção das cianobactérias foi maior para uma elevada frequência (1320 KHz) conjugada com uma potência de 80 W. No entanto, a utilização de altas potências deu origem a um incremento de microcistinas extracelulares aquando da prolongação do tempo de exposição. Após cinco minutos de exposição, a concentração de microcistinas solubilizadas quase quadruplicou (80 W; 80 KHz). Resultados admissíveis, em termos de libertação de toxinas, foram alcançados para potências inferiores a 48 W, associadas a uma frequência de 80 KHz, sob um período de exposição de cinco minutos, a partir das quais não observaram qualquer libertação de toxinas para o meio solúvel.

Hao *et al.* (2004b) observaram os efeitos dos ultra-sons na espécie filamentosa *Spirulina (Arthrospira) platensis*, utilizando uma elevada frequência de 1,7 MHz e uma baixa frequência de 20 KHz. Os maiores efeitos em termos de crescimento (redução de 50,0%) e, também, de actividade fotossintética (redução da concentração em clorofila *a* e da absorvância de ficocianinas, de 36,2% e 59,2% respectivamente) foram verificados para um tempo de exposição óptimo de cinco minutos. No entanto, as cianobactérias recuperaram o seu crescimento após três dias da submissão aos ultra-sons.

Conforme grande parte dos estudos, descritos anteriormente, a tecnologia ultra-sónica no controlo de *blooms* de cianobactérias ostenta uma maior eficácia em termos imediatos, sugerindo de certo modo uma aplicação contínua dos ultra-sons para o efeito.

1.3.3 Efeitos biológicos nos ecossistemas aquáticos

Os efeitos biológicos que os ultra-sons possam induzir nos ecossistemas aquáticos, quando aplicados para o controlo de *blooms* de cianobactérias, ainda são ambíguos, ou mesmo desconhecidos.

Em 1927, Wood & Loomis, citados por Dunn (1982), conduziram um estudo onde descreveram a destruição de algas verdes filamentosas (*Spirogyra*) e a morte de pequenos peixes e rãs após a exposição ultra-sónica durante vários minutos, para uma frequência de 300 kHz e uma intensidade ultra-sónica de 10 W/cm², aproximadamente. Esta primeira

experiência impulsionou investigações mais aprofundadas sobre a interacção entre a intensidade ultra-sónica e tecidos de mamíferos. Os primeiros resultados mostraram principalmente efeitos biológicos negativos em tecidos e células. Por outro lado, experiências laboratoriais posteriores demonstraram que a incubação de ovos de peixes, por exemplo, perante uma exposição ultra-sónica três vezes por dia, a uma frequência de 1 MHz durante 35 minutos, é acelerada para 6 dias (em vez de 7 dias característicos de incubação) e que uma maior percentagem dos ovos é fecundada. Estes organismos fecundados evidenciaram uma maior taxa de sobrevivência quando comparados com os peixes que não foram submetidos aos ultra-sons (Mason, 1996).

Contudo, existe um número reduzido de pesquisas relacionadas com a exposição de organismos aquáticos aos ultra-sons, sendo que as mesmas pesquisas avaliam unicamente a sensibilidade auditiva de algumas espécies marinhas, como o bacalhau e a sardinha espanhola (*Sardinella aurita*) (Simmonds & MacLennan, 2005).

Uma empresa canadiana (Canadianpond.ca) divulgou o artigo “Ultra Sonic Algae Control – A non-chemical approach to eliminating algae using ultrasound waves”, onde é apresentado o impacto da irradiação ultra-sónica em diversos tipos de algas. Segundo o artigo, a aplicação dos ultra-sons demonstra uma eficácia de 75% a 95% na eliminação de determinadas algas como de colónias de *Microcystis* spp. (75%), dos géneros *Pithophora* spp. (95%) e da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (75%). Outras espécies de algas, de acordo com o artigo, são também efectivamente eliminadas pela acção ultra-sónica (Quadro 1.3.3.1), enquanto espécies de *Chara*, *Nitella*, *Euglena*, *Pediastrum* e *Oscillatoria* não exibem qualquer alteração.

Quadro 1.3.3. 1 – Espécies de algas efectivamente eliminadas pela radicação ultra-sónica (*Ultrasonic algae control – A non-chemical approach to eliminating algae using ultrasound waves*, 1999-2007).

Tipos de Algas		
<i>Anabaena</i> spp.	<i>Cryptomonas</i> spp.	<i>Oocystis pusilla</i>
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	<i>Dictyosphaerium</i> spp.	<i>Phacus</i> spp.
<i>Aphanizomenon</i> spp.	<i>Gloeocystis</i> spp.	<i>Pinnularia</i> spp.
<i>Cladophora</i> spp.	<i>Gomphonema</i> spp.	<i>Rhodomonas minuta</i>
<i>Chlorella</i> spp.	<i>Lagertheima</i> spp.	<i>Scenedesmus acuminates</i>
<i>Coelastrum</i> spp.	<i>Merismopedia tenuíssima</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
<i>Cyclotella</i> spp.	<i>Navicula mínima</i>	<i>Spirogyra</i> spp.
<i>Cryptomonas erosa</i>	<i>Nitzschia</i> spp.	<i>Ulothrix</i> spp.

Adicionalmente, o artigo realça que o controlo de algas através de ultra-sons não é recomendado em todos ou em alguns lagos naturais, dada a susceptibilidade de organismos aquáticos, como peixes e plantas, às forças energéticas geradas que podem afectar a sua actividade.

2. OBJECTIVOS

A presente dissertação teve por objectivo avaliar os efeitos da irradiação ultra-sónica na inibição do crescimento de cianobactérias, em particular do género *Microcystis* spp., nomeadamente o colapso das vesículas gasosas.

Paralelamente a esta avaliação, pretendeu-se igualmente avaliar alguns parâmetros de qualidade da água e relacioná-la com a eventual ocorrência de reacções oxidativas induzida pela aplicação de ultra-sons, assim como a influência da irradiação ultra-sónica na integridade das células das espécies e consequente libertação de microcistinas para a fase solúvel.

3. METODOLOGIA

3.1 PREPARAÇÕES DAS CULTURAS DE CIANOBACTÉRIAS (CULTURAS MISTAS)

As culturas constituídas maioritariamente por cianobactérias (culturas mistas) foram obtidas por inoculação de amostras de fitoplâncton recolhidas na Lagoa das Furnas (Ilha de São Miguel, Açores), em Meio BG 11 (500 mL). Este meio foi seleccionado para potenciar o desenvolvimento de colónias de *Microcystis* spp..

O meio de cultura BG11 foi preparado de acordo com o apresentado no Anexo I.

As culturas foram mantidas numa câmara de cultura (Fitoclima 4600 - ARALAB), com períodos diurno e nocturno de 12 horas cada, a uma temperatura de 22 °C e 18 °C, respectivamente. Os tempos de crescimento de cada cultura foram de 7 a 23 dias, conforme o Quadro 3.1.1.

Quadro 3.1. 1 – Idade das culturas correspondente a cada ensaio.

Ensaio	Idade da cultura (dias)
1º	22
2º	7
3º	9
4º	7
5º	7
6º	23

O pH de cada cultura foi controlado a cada 2 dias e corrigido para valores entre os 7,5 e 8,0, sempre que necessário.

No dia de cada ensaio com ultra-sons, procedeu-se à diluição de cada cultura com 2 L de Meio BG11, perfazendo um volume total de 2,5 L. Este volume foi posteriormente distribuído uniformemente por três frascos de 500 mL, destinados à submissão aos ultra-sons, e dois Erlenmeyers de 1 L, que permaneceriam como controlo (Quadro 3.1.2).

Quadro 3.1. 2 – Amostras utilizadas para cada ensaio.

Amostra	Descrição
US x – 0	Amostra controlo para a determinação de parâmetros abióticos do ensaio x;
US x – A	Amostra submetida aos ultra-sons para a determinação de parâmetros abióticos do ensaio x, em duplicado;
x C	Amostra controlo para a avaliação da morfologia e do crescimento da <i>Microcystis</i> spp do ensaio x;
US x – C	Amostra submetida aos ultra-sons para a avaliação da morfologia e do crescimento da <i>Microcystis</i> spp do ensaio x.

3.2 ENSAIOS COM ULTRA-SONS

A tecnologia ultra-sónica utilizada nos vários ensaios consistiu num sistema de banho de ultra-sons (modelo Transsonic TI-H5, da Elma) (Figura 3.2.1), cujas características são apresentadas no Quadro 3.2.1.



Figura 3.2. 1 – Sistema de banho de ultra-sons (Elma GmbH & Co. KG, cop. 2009).

Quadro 3.2. 1 – Características gerais do equipamento ultra-sónico (Elma GmbH & Co. KG, 2009).

Modelo Transsonic TI-H5, Elma	
Frequências	35 KHz e 130 KHz
Amplitude	10% a 100%
Input de potência	500 W
Intensidade ultra-sónica (energia dissipada no reactor)	2,5 W/cm ²
Transdutores	Piezoeléctricos
Capacidade	3,5 L
Dimensões	240 mm × 130 mm × 150 mm

3.2.1 Selecção dos parâmetros ultra-sónicos (frequência, amplitude e tempo)

Seleccionaram-se diferentes frequências disponibilizadas pelo equipamento ultra-sónico e para cada uma delas fez-se variar a amplitude. Cada ensaio foi realizado com base na conjugação de parâmetros, seguidamente descrita:

Ensaio 1: Frequência de 35 KHz e amplitude de 20%

Ensaio 2: Frequência de 35 KHz e amplitude de 50%

Ensaio 3: Frequência de 35 KHz e amplitude de 100%

Ensaio 4: Frequência de 130 KHz e amplitude de 20%

Ensaio 5: Frequência de 130 KHz e amplitude de 50%

Ensaio 6: Frequência de 130 KHz e amplitude de 100%

As amplitudes de 20%, 50% e 100% correspondem às potências de 100 W, 250 W e 500 W, respectivamente.

O tempo de exposição aos ultra-sons foi de cinco minutos para todos os ensaios realizados. A selecção deste parâmetro de sonicação teve por base a informação disponibilizada pelos vários estudos com ultra-sons descritos anteriormente (Hao *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

3.2.2 Determinação de parâmetros abióticos

A determinação dos parâmetros abióticos foi efectuada imediatamente antes e após a sonicação.

3.2.2.1 Temperatura

A temperatura foi medida através de um termómetro analógico.

3.2.2.2 Oxigénio dissolvido

A determinação do oxigénio dissolvido foi efectuada pelo método potenciométrico (Potenciómetro inoLab Oxi 730).

3.2.2.3 pH

Na determinação do pH recorreu-se ao método potenciométrico (Potenciómetro inoLab pH/ION 735).

3.2.2.4 Turvação

A determinação da turvação foi efectuada de acordo com o método nefelométrico (Turbidímetro Hanna Instruments). Os resultados de turvação são expressos em unidades de turvação nefelométricas, NTU (Nephelometric Turbidity Unit).

3.2.2.5 Sólidos Suspensos Totais (SST)

Os sólidos suspensos totais foram determinados com base no método gravimétrico, após filtração em vácuo, em membrana de microfibras de vidro Whatman, GF/C ou equivalente – Filter Lab Ref. MFV3.

3.2.3 Clorofila *a* e Feopigmentos

Os parâmetros de clorofila *a* e feopigmentos foram determinados conforme o método espectrofotométrico (Clesceri *et al.*, 1998).

De acordo com o método supracitado, a determinação da clorofila *a* consistiu na extracção dos pigmentos contidos na biomassa com acetona em solução aquosa a 90%, durante 24 horas a uma temperatura de 4°C; procedimento executado após filtração em vácuo em membrana de microfibras de vidro Whatman, GF/C ou equivalente – Filter Lab Ref. MFV3. Após extracção, procedeu-se à centrifugação dos extractos a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 20 minutos. Num espectrofotómetro (Pharmacia LKB - Ultrospec Plus)

determinaram-se as absorvâncias dos extractos clarificados para os comprimentos de onda de 750 nm e 664 nm, em células com 1 cm de percurso óptico. Após acidificação dos extractos com HCL 0,1N, procedeu-se novamente às leituras das absorvâncias a 750 nm e 665 nm após 90 s.

As concentrações de clorofila *a* e de feopigmentos de cada amostra foram obtidas com base nas seguintes expressões:

$$CL_a, mg/m^3 = \frac{26,7 \times [(A_0 664 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] \times V_1}{V_2 \times L}$$

$$Feo, mg/m^3 = \frac{26,7 \times [1,7 \times (A_0 664 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] \times V_1}{V_2 \times L}$$

Onde:

V_1 = Volume de extracto (L);

V_2 = Volume de amostra (m^3);

L = Percurso óptico da célula (cm);

$A_0 664$ e $A_0 750$ = Absorvâncias a 664 nm e a 750 nm antes da acidificação;

$A_a 665$ e $A_a 750$ = Absorvâncias a 665 nm e a 750 nm após acidificação.

O valor 26,7 corresponde à correcção da absorvância e é igual a $A \times K$, onde:

A = Coeficiente de absorção da clorofila *a* a 664 nm = 11,0

K = Razão que exprime a correcção para a acidificação = 2,43

3.2.4 Quantificação de microcistinas intracelulares e extracelulares

A quantificação de microcistinas intracelulares e extracelulares foi obtida através do método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).

Volumes de 210 mL e 250 mL de cada amostra foram previamente filtrados (filtração a vácuo), através de filtros de microfibras de vidro Whatman, GF/F ou equivalente – Filter Lab Ref. MFV5, de forma a separar as fracções de toxinas em solução na água (microcistinas extracelulares) das toxinas contidas nas células (microcistinas intracelulares). A extracção de microcistinas intracelulares foi precedida de uma conservação dos filtros a uma temperatura aproximada de $-18\text{ }^\circ\text{C}$, durante um período máximo de 30 dias.

Extracção de microcistinas intracelulares

A extracção das microcistinas em solução existentes em cada amostra filtrada foi efectuada em colunas de extracção em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction) do tipo C18 (Sep-pak cartridge vac 6cc, Waters), a um fluxo aproximado de 10 mL.min⁻¹. Previamente à extracção, procedeu-se à limpeza dos cartuchos com 2,5 mL de metanol a 100% e água destilada. Para o arrastamento de outras substâncias, que não as microcistinas, eventualmente presentes nos cartuchos foram adicionados 2 mL de metanol a 20%. As toxinas solubilizadas foram depois eluídas com 2 mL de metanol contendo 0,2% de TFA e evaporadas em corrente de azoto. Os resíduos resultantes da evaporação foram posteriormente redissolvidos em 250 µL de metanol a 50% e seguidamente centrifugados a 30 rpm durante 10 minutos. Por fim, o sobrenadante dos centrifugados foi analisado por HPLC.

Extracção de microcistinas extracelulares

O congelamento dos filtros com a biomassa teve por objectivo promover a lise das células de forma a libertar as microcistinas intracelulares. Após o descongelamento dos filtros, adicionou-se-lhes 10 mL de metanol a 100%, em tubos de centrifugação, tendo sido mantidos a temperaturas de -18 °C durante mais 24 horas. Terminado este período, efectuou-se a centrifugação dos tubos a 30 rpm durante 15 minutos e posterior evaporação, a cerca de 40 °C, num evaporador rotativo (Rotavapor BÜCHI 461). Adicionou-se mais 10 mL de metanol a 100% a cada tubo de modo a extrair o máximo de microcistinas e aguardou-se uma hora para uma nova evaporação. Os resíduos resultantes da evaporação foram redissolvidos com 1 mL ou 2 mL de metanol a 50%, com a finalidade de se recuperar o máximo de resíduos evaporados. Seguidamente, os resíduos em solução foram centrifugados a 30 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi analisado por HPLC.

3.2.5 Avaliação morfológica por microscopia do género *Microcystis* spp.

A avaliação morfológica do género *Microcystis* spp. foi efectuada por microscopia (Microscópio Leica DM LB com câmara digital Leica acoplada). Esta avaliação foi realizada nas amostras controlo (xC) e nas amostras submetidas a ultra-sons (USx-C) de cada ensaio, utilizando uma resolução microscópica de 100x.

3.2.6 Avaliação da recuperação do crescimento das cianobactérias após sonicação

A avaliação da recuperação do crescimento da *Microcystis* spp. foi realizada durante 14 dias após cada ensaio. Para o efeito determinou-se a densidade óptica da amostra controlo (xC) e da amostra submetida aos ultra-sons (USx-C) num espectrofotómetro (Pharmacia LKB - Ultrospec Plus). Adoptou-se um comprimento de onda de 684 nm, ao qual ocorre segundo vários estudos uma maior absorvância de suspensões de *Microcystis* spp. (Ma *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006a, 2006b).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETROS ABIÓTICOS, CLOROFILA A E FEOPIGMENTOS PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRA-SONS

4.1.1 Temperatura

Na Figura 4.1.1.1 pode ser observada a variação da temperatura do meio de cada ensaio, imediatamente antes e após a sonicação, e na Figura 4.1.1.2 o acréscimo correspondente, expresso em percentagem.

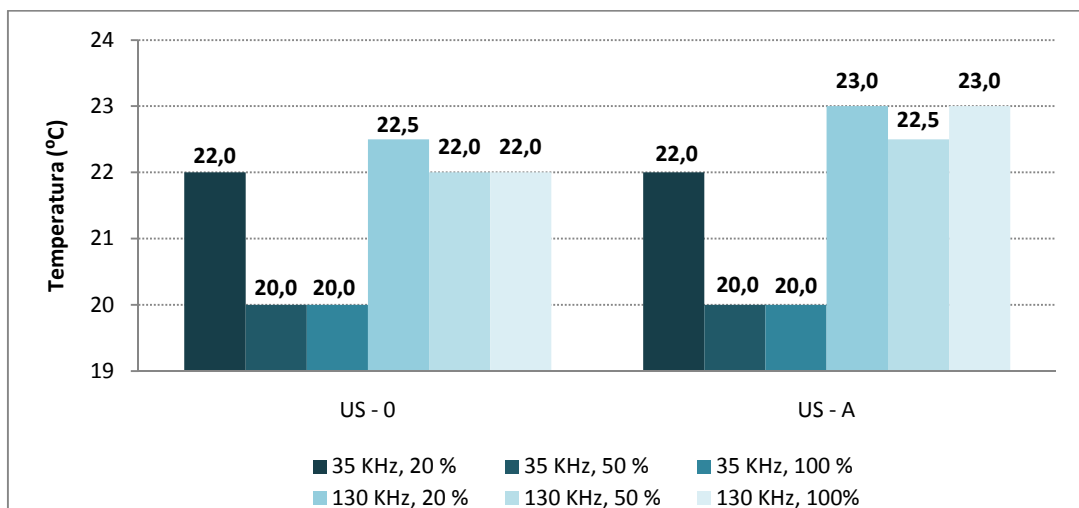


Figura 4.1.1. 1 – Variação da temperatura de cada ensaio.

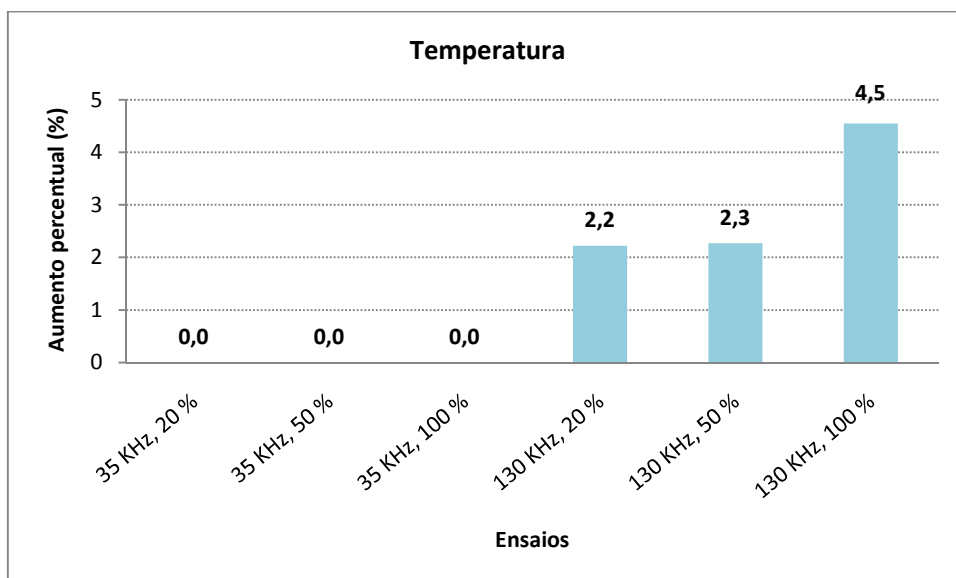


Figura 4.1.1. 2 – Acréscimo percentual da temperatura de cada ensaio.

Como se pode verificar, nos três primeiros ensaios, cuja frequência utilizada foi de 35 KHz, não se verificou qualquer alteração da temperatura para as diferentes amplitudes. No entanto, o aumento esperado da temperatura, induzido pelos ultra-sons, foi observado para a frequência de 130 KHz, nas diferentes amplitudes, com uma diferença mais acentuada na amplitude mais elevada (amplitude de 100%, equivalente a 500 W), com um acréscimo associado de 4,5% (Figura 4.1.1.2).

Chi *et al.* (2003), que avaliaram os efeitos dos ultra-sons num lago eutrófico, também verificaram um aumento da temperatura imediatamente após a sonicação (22 KHz e 630 W), obtendo um aumento de 3°C no terceiro dia após a aplicação dos ultra-sons.

4.1.2 Oxigénio dissolvido (OD)

O oxigénio dissolvido (OD) foi determinado imediatamente antes e após a sonicação (Figura 4.1.2.1).

Na Figura 4.1.2.2 é apresentado o acréscimo percentual de oxigénio dissolvido de cada ensaio.

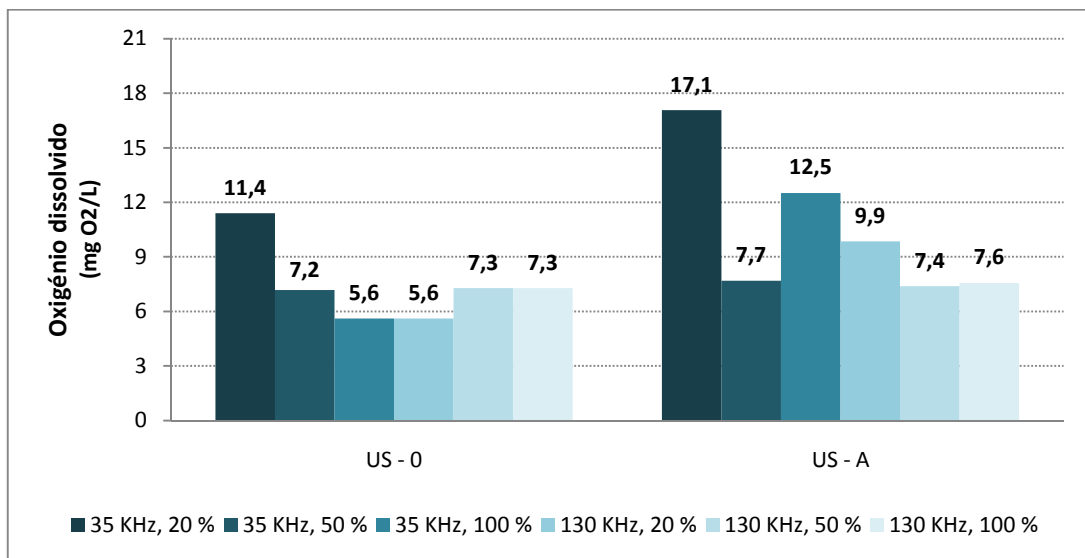


Figura 4.1.2. 1 – Variação do oxigénio dissolvido de cada ensaio.

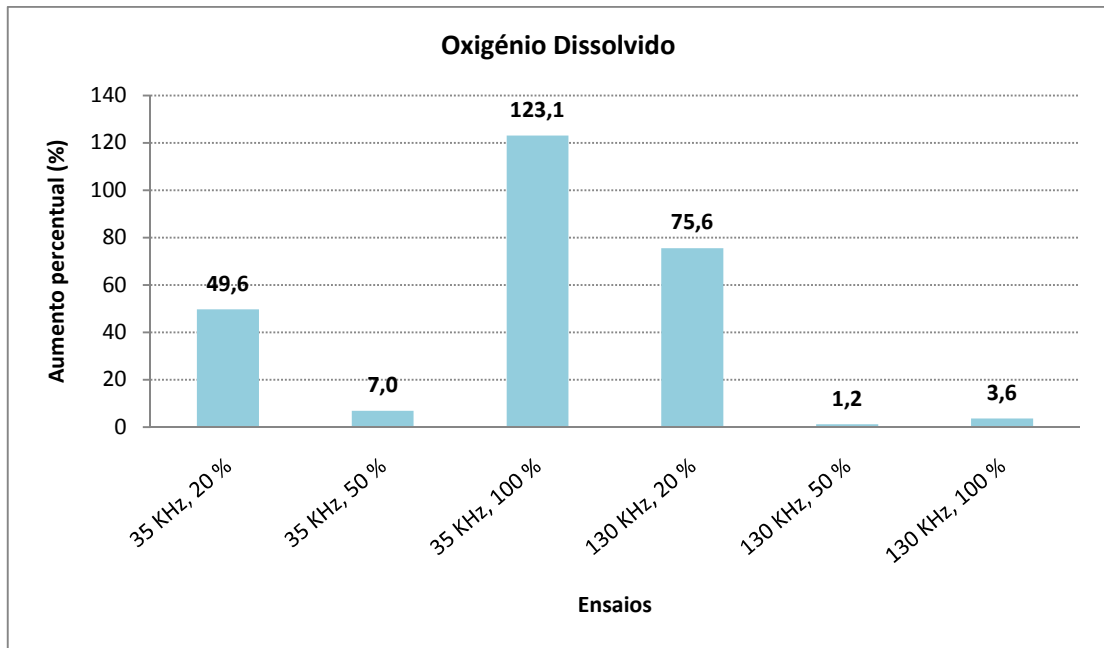
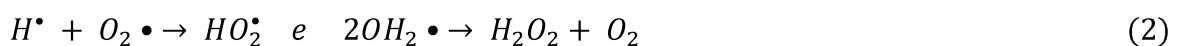


Figura 4.1.2. 2 – Acréscimo percentual do oxigénio dissolvido de cada ensaio.

Após a sonicação verificou-se um aumento do OD em todos os ensaios, com variações significativas entre eles (Figuras 4.1.2.1 e 4.1.2.2).

O maior incremento de OD foi observado no Ensaio 3, com uma frequência de 35 KHz e uma amplitude de 100% (500 W), associado a um acréscimo percentual de 123,1%. No Ensaio 4, verificou-se igualmente um aumento significativo de OD na ordem dos 75,8%. Por outro lado, observaram-se acréscimos de OD pouco significativos, entre 1% e 7%, nos Ensaio 2, 5 e 6.

As hipóteses explicativas para o aumento de OD nas culturas submetidas à sonicação poderão estar associadas a erros do operador, à agitação provocada pelo processo de irradiação e/ou à predominância das seguintes reacções oxidativas:



Porém, estes resultados diferem dos obtidos no estudo realizado por Chi *et al.* (2003), em que se verificaram decréscimos do oxigénio dissolvido nas culturas submetidas à sonicação (630 W, 22 KHz e 40 s e 210 s, durante nove dias). Zhang *et al.* (2006a), para compreenderem a influência da cavitação acústica sobre a actividade fotossintética de *Microcystis aeruginosa*, avaliaram a taxa de evolução do oxigénio, obtendo uma redução de 40,5% após cinco minutos de sonicação (Sistema sonda: 25 KHz e 80 W).

4.1.3 pH

Na Figura 4.1.3.1 é apresentada a variação do pH, imediatamente antes e após a sonicação, de cada ensaio e na Figura 4.1.3.2 o acréscimo correspondente, expresso em percentagem.

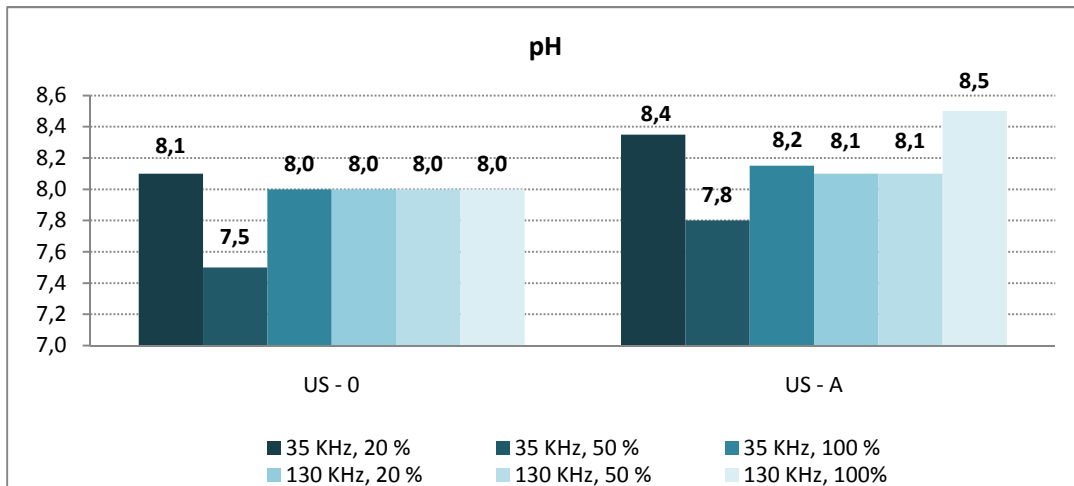


Figura 4.1.3. 1 – Variação do pH de cada ensaio.

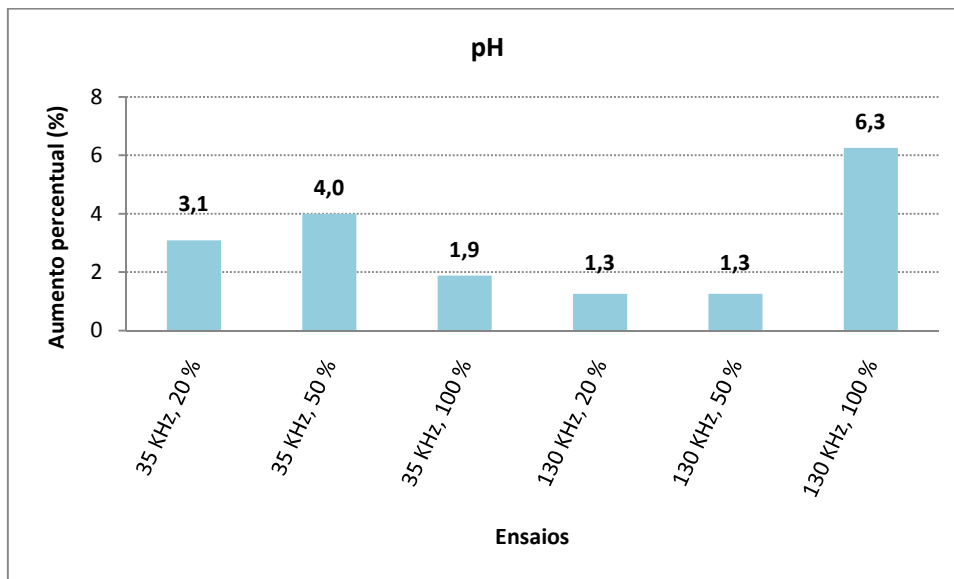


Figura 4.1.3. 2 – Acréscimo percentual do pH de cada ensaio.

Um ligeiro aumento do pH foi verificado em todos os ensaios, imediatamente após a sonicação, sem qualquer tendência linear nos resultados (Figuras 4.1.3.1 e 4.1.3.2).

No Ensaio 6 (130 KHz e 100%) observou-se uma variação mais significativa do pH, com um acréscimo de 6,3%, ao contrário dos ensaios 4 e 5 com um acréscimo idêntico de 1,3% (Figura 4.1.3.2).

Comparando os resultados obtidos entre os valores de OD e de pH dos vários ensaios parece existir uma correlação positiva com os dois parâmetros, isto é, ambos aumentaram após a sonicação relativamente às respectivas amostras controlo. Uma explicação possível para o aumento do pH reside na predominância de reacções entre os radicais, H^\bullet e O , com moléculas de água para formar radicais OH^\bullet (Equações 3 e 4):



De certo modo, estas reacções químicas podem estar relacionadas com o aumento simultâneo do OD, uma vez que a formação de O_2 envolve a presença de radicais OH^\bullet , como demonstrado anteriormente (Equações 1 e 2).

Contudo, os efeitos esperados pela aplicação dos ultra-sons eram de uma redução dos dois parâmetros, dado o poder oxidativo dos radicais OH^\bullet sobre moléculas de N_2 e O_2 , originando, por exemplo, compostos ácidos e H_2O_2 . Sugere-se que a taxa de produção de radicais OH^\bullet foi superior à taxa de reacções oxidativas com eventuais compostos inorgânicos presentes nas amostras e/ou inferior a eventuais mecanismos de defesa antioxidantes das células (ficobiliproteínas). Outro factor provavelmente associado à produção de radicais livres consistiu no tempo de exposição à sonicação. Segundo Mead *et al.* (1976), o aumento do tempo de sonicação, em águas saturadas com ar, N_2 , árgon e O_2 , induz uma redução gradual do pH relacionada com a produção de ácidos. Neste sentido, os cinco minutos de exposição aplicados no presente trabalho podem ter sido insuficientes para obter aquele resultado.

Zhang *et al.* (2006a) verificaram um ligeiro decréscimo do pH de uma suspensão de *M. aeruginosa*, de 7,6 para 7,3, após cinco minutos de sonicação (25 KHz e 80 W). A abordagem efectuada por Chi *et al.* (2003) mostrou valores de OD, assim como de pH, ligeiramente inferiores na amostra logo após a sonicação (22 KHz e 630 W), comparativamente com os valores obtidos na amostra controlo.

4.1.4 Turvação

Nas Figuras 4.1.4.1 e 4.1.4.2 é apresentada a variação da turvação obtida em cada ensaio e a redução percentual associada.

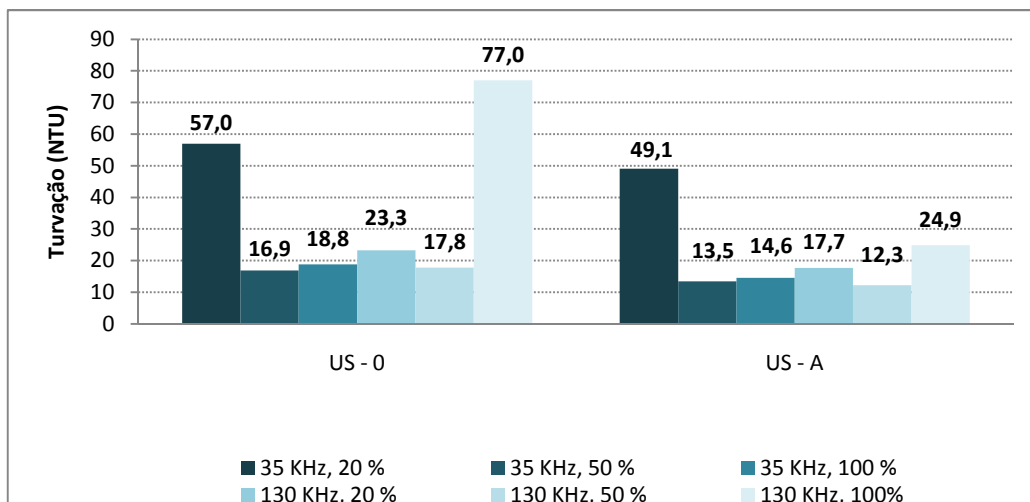


Figura 4.1.4. 1 – Variação da turvação de cada ensaio.

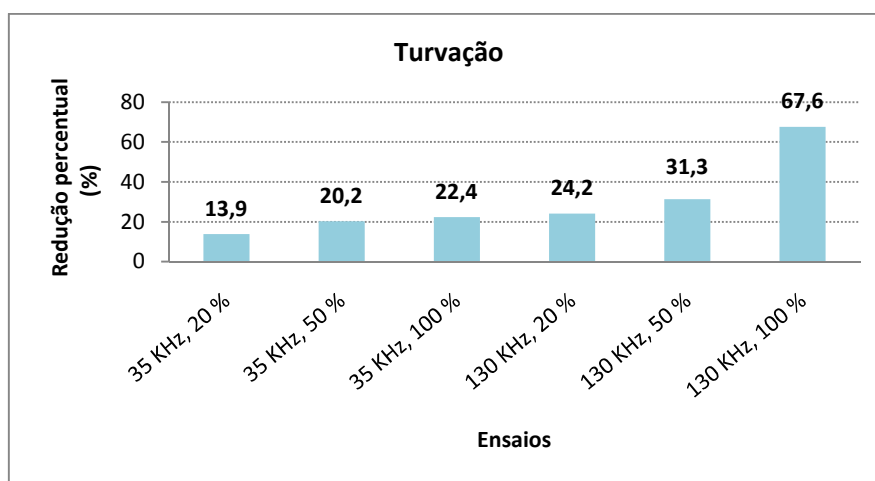


Figura 4.1.4. 2 – Redução percentual da turvação de cada ensaio.

De acordo com as Figuras 4.1.4.1 e 4.1.4.2, é possível verificar existir uma relação entre a remoção da turvação e os parâmetros ultra-sónicos, frequência e amplitude. A frequência é o parâmetro ultra-sónico que parece ter uma maior influência sobre o decréscimo da turvação. Apesar de se observar uma redução da turvação crescente para ambas as frequências com o aumento da amplitude, obtiveram-se reduções mais significativas para a frequência mais alta (130 KHz), especialmente para a amplitude de 100%.

Realça-se a maior percentagem de redução da turvação no Ensaio 6, de cerca de 68%, e a respectiva diferença comparativamente aos valores percentuais dos restantes ensaios, entre 14% e 31%, aproximadamente. De salientar ainda a similaridade de efeito sobre a turvação entre os ensaios 2, 3, e 4, com frequências e amplitudes de 35 KHz e 50%, 35 KHz e 100% e 130 KHz e 20%, respectivamente.

4.1.5 Clorofila α e Feopigmentos

O Quadro 4.1.5.1 representa as concentrações de clorofila α determinadas em cada um dos ensaios antes e após a sonicação e as concentrações de feopigmentos das amostras controlo (US-0). Na Figura 4.1.5.1 é apresentada a redução percentual associada às concentrações de clorofila α .

Quadro 4.1.5. 1 – Concentrações de clorofila α antes e após a sonicação e concentração de feopigmentos das amostras controlo (US-0).

ENSAIOS	Clorofila α (mg/m ³)		Feopigmentos (mg/m ³)
	US - 0	US - A	
35 KHz, 20%	341,0	322,9	957,2
35 KHz, 50%	160,2	152,2	463,0
35 KHz, 100%	253,8	100,1	775,6
130 KHz, 20%	240,3	136,2	683,3
130 KHz, 50%	96,12	93,32	281,2
130 KHz, 100%	388,6	418,4	1121,4

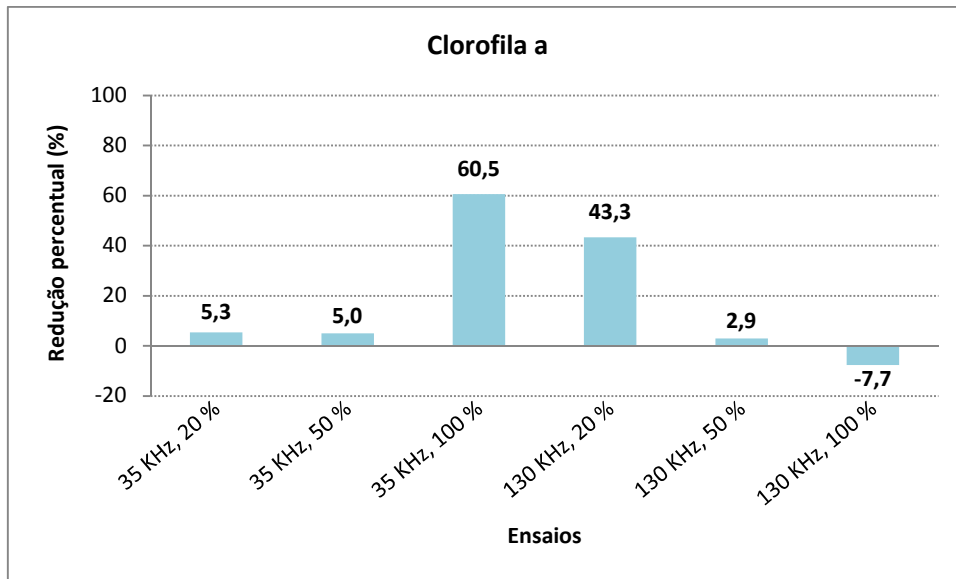


Figura 4.1.5. 1 – Redução percentual de clorofila *a* de cada ensaio.

Em todos os ensaios se verificou uma redução em clorofila *a*, excepto no Ensaio 6 (130 KHz e 100%). Neste último ensaio terá, provavelmente, ocorrido um erro experimental que conduziu a um resultado que não era expectável.

Os decréscimos mais significativos foram observados no Ensaio 3 (35 KHz e 100%), seguido do Ensaio 4 (130 KHz e 20%), com percentagens de redução em clorofila *a* de 60,5% e 43,3%, respectivamente (Figura 4.1.5.1).

Relativamente às concentrações de feopigmentos foi possível aferir que os ensaios representativos de maiores concentrações corresponderam às culturas com maiores períodos de incubação (ensaio 1 e 6), ou seja, a populações fitoplanctónicas mais envelhecidas. Deste modo, a irradiação ultra-sónica aparenta exercer uma reduzida influência em culturas mais envelhecidas, uma vez que onde se verificaram maiores reduções das concentrações de clorofila *a* não corresponderam às culturas de maior tempo de incubação (ensaios 3 e 4) (Quadro 4.1.5.1).

De acordo com diversas pesquisas, a irradiação ultra-sónica aparenta induzir instantaneamente a redução de clorofila *a* em suspensões de *Microcystis* spp., com algumas variações mediante os parâmetros ultra-sónicos adoptados. Com uma frequência de 25 KHz, uma potência de 80 W e um tempo de exposição de cinco minutos, Zhang *et al.* (2006a) obtiveram uma diminuição instantânea da concentração de clorofila *a* de 21,3%. Lee *et al.* (2001) estudaram a influência dos ultra-sons na actividade fotossintética da *M. aeruginosa* e *M. viridis* através da fluorescência de clorofila. Neste trabalho, os autores observaram que as

células das espécies analisadas, quando expostas a três potências diferentes (40 W, 120 W e 1200 W) para uma frequência constante (28 KHz) e para diferentes tempos de exposição (30 s, 60 s, 90 s e 120 s), reduziram a sua actividade fotossintética, sendo a maior redução obtida para a potência mais elevada (1200 W) e para o menor tempo de exposição (30 s). Os mesmos autores constataram ainda efeitos mais significativos na actividade fotossintética da *M. aeruginosa* relativamente à espécie *M. viridis*.

Deste modo, os decréscimos acentuados das concentrações de clorofila *a* verificados nos ensaios 3 e 4 terão sido provocados por uma ruptura das membranas das células, assim como das membranas dos tilacóides, em resultado da cavitação acústica.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRASONS

4.2.1 Microcistinas intracelulares

As concentrações de microcistinas intracelulares obtidas para cada ensaio foram expressas em $\mu\text{g M C-LR equiv./g}$ de biomassa seca. Para o efeito determinaram-se primeiramente as concentrações de microcistinas em $\mu\text{g MC-LR equiv./L}$ e os sólidos suspensos totais (SST) constantes no Anexo II.

No Quadro 4.2.1.1 é apresentada a quantificação de microcistinas intracelulares (biomassa) de cada um dos seis ensaios realizados, antes e após a sonicação e na Figura 4.2.1.1 a redução percentual associada.

Quadro 4.2.1. 1 – Quantificação de microcistinas na biomassa de cada ensaio.

ENSAIOS	Microcistinas Intracelulares ($\mu\text{g MC-LR equiv./g}$)	
	US - 0	US - A
35 KHz, 20%	1100,0	1033,8
35 KHz, 50%	265,7	187,0
35 KHz, 100%	53,6	27,1
130 KHz, 20%	43,8	26,2
130 KHz, 50%	1704,3	1258,6
130 KHz, 100%	721,4	685,4

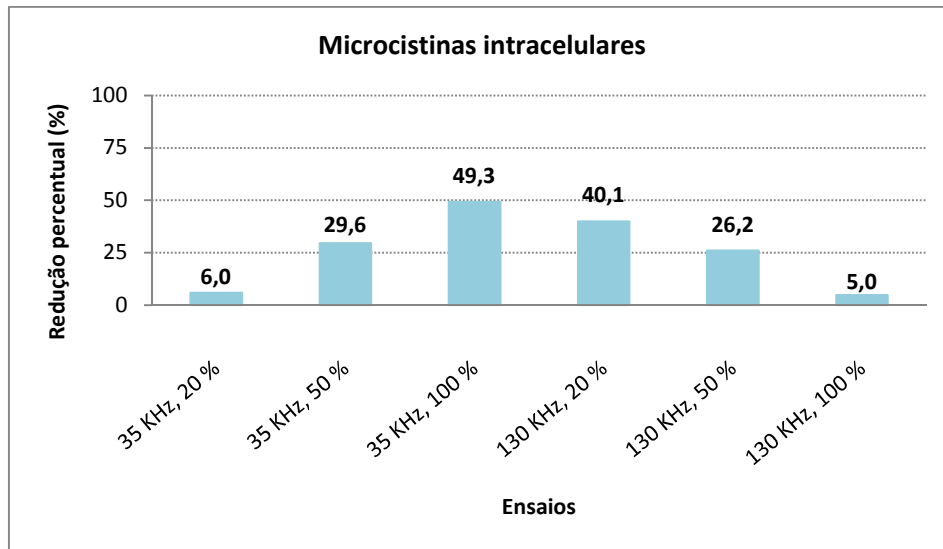


Figura 4.2.1. 1 – Redução percentual de microcistinas na biomassa após sonicação.

De acordo com o Quadro 4.2.1.1 e a Figura 4.2.1.1, todos os ensaios apresentaram uma redução das microcistinas intracelulares (biomassa).

O Ensaio 3 (35 KHz e 100%) foi o que apresentou uma maior redução de microcistinas na biomassa, de 53,6 µg MC-LR equiv./L para 27,1 µg MC-LR equiv./L, logo seguido do Ensaio 4 (130 KHz e 20%) com um decréscimo de 43,8 µg MC-LR equiv./L para 26,2 µg MC-LR equiv./L, correspondentes a reduções percentuais de 49,3% e 40,1%, respectivamente. Esta avaliação é consistente com a realizada para a clorofila *a*, visto que os mesmos ensaios apresentaram uma maior redução neste parâmetro.

Por outro lado, no Ensaio 1 (35 KHz e 20%) e no Ensaio 6 (130 KHz e 100%) ocorreram reduções de microcistinas intracelulares de 6,0% e 5,0%, respectivamente.

Os resultados obtidos para a amplitude de 50%, correspondentes aos ensaios 2 e 5, foram similares.

A redução em microcistinas na biomassa pode ser explicada pelos efeitos dos ultra-sons ao provocarem a lise das células *Microcystis* spp. e a consequente libertação de microcistinas para o meio envolvente.

Constatou-se ainda que para a frequência mais baixa, de 35 KHz, a redução de microcistinas intracelulares foi tanto maior quanto maior a amplitude. Para 130 KHz, a frequência mais alta, esta redução foi menor para amplitudes mais elevadas. Deste modo, é possível verificar que para uma frequência alta e amplitude baixa, os efeitos dos ultra-sons na redução de microcistinas na biomassa foram similares aos verificados para uma frequência baixa e amplitude elevada.

É ainda de salientar que, à partida, a cavitação acústica não exerce uma influência significativa em culturas com maior tempo de incubação. Os ensaios onde se verificou menor libertação de microcistinas correspondiam a maiores períodos de incubação, mais precisamente os ensaios 1 e 6 com 22 dias e 23 dias, respectivamente. Esta verificação foi consistente com a obtida para a clorofila *a*.

4.2.2 Microcistinas extracelulares

A quantificação de microcistinas extracelulares em solução de cada ensaio realizado com ultra-sons e a redução percentual associada são ilustradas no Quadro 4.2.2.1 e Figura 4.2.2.1, respectivamente.

Quadro 4.2.2. 1 – Quantificação de microcistinas no meio solúvel de cada ensaio.

ENSAIOS	Microcistinas Extracelulares ($\mu\text{g MC-LR equiv./L}$)	
	US - 0	US - A
35 KHz, 20%	0,6	0,8
35 KHz, 50%	6,9	8,5
35 KHz, 100%	2,2	2,6
130 KHz, 20%	0,43	1,3
130 KHz, 50%	1,0	1,9
130 KHz, 100%	3,3	2,3

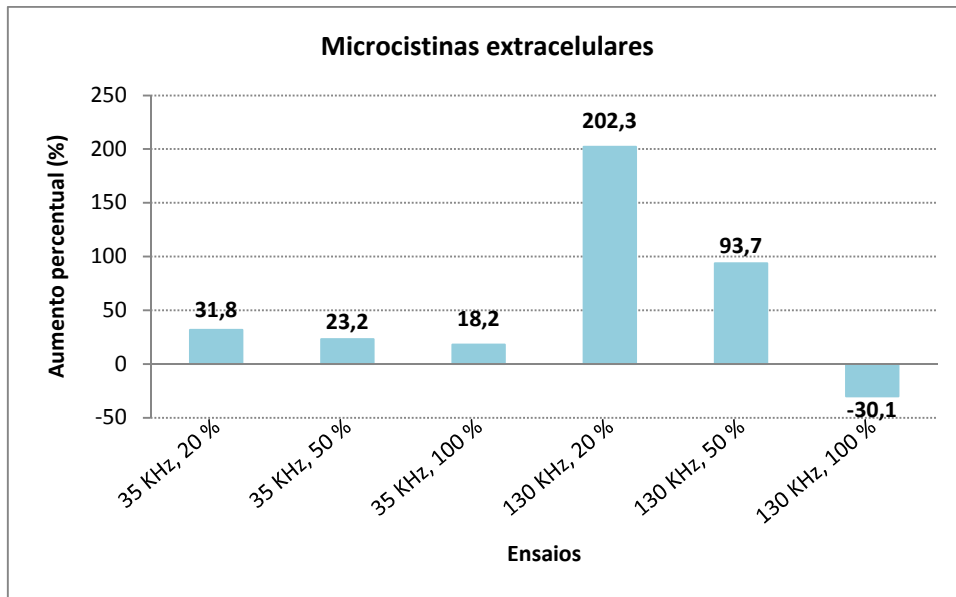


Figura 4.2.2. 1 – Aumento percentual de microcistinas no meio solúvel após sonicação.

O aumento de microcistinas extracelulares em solução foi geral em todos os ensaios realizados, excepto no Ensaio 6 (Quadro 4.2.2.1 e Figura 4.2.2.1). A eventual fragmentação das células, devida à cavitação acústica, e subsequente libertação de materiais intracelulares, neste caso microcistinas, é consubstanciada pelo aumento resultante de microcistinas no meio solúvel após a sonicação. No entanto, a secreção de mais toxinas por parte das espécies como mecanismo de defesa à sonicação também pode representar outra forma de explicar o aumento das concentrações de microcistinas extracelulares.

Analisando o Quadro 4.2.2.1 e a Figura 4.2.2.1, verifica-se que sucedeu um maior aumento de microcistinas solúveis no Ensaio 4 (130 KHz e 20%) de 0,43 µg MC-LR equiv./L para 1,3 µg MC-LR equiv./L, correspondendo a um acréscimo percentual de 202,3%. O ensaio 5 (130 KHz e 50%) também apresentou uma quantidade bastante significativa de microcistinas extracelulares após a sonicação, associada a um aumento percentual de 93,7%.

No Ensaio 6 (130 KHz e 100%) ocorreu uma redução de microcistinas extracelulares de cerca de 30,1%, que pode ter sido devida à degradação de toxinas em solução através de reacções de radicais livres produzidos durante a cavitação.

Aparentemente, a degradação de microcistinas solúveis ocorreu igualmente nos ensaios 2 e 3, uma vez que as percentagens de libertação de microcistinas intracelulares (biomassa) para o meio solúvel (29,6% e 49,3%, respectivamente) foram superiores aos aumentos percentuais de microcistinas extracelulares (23,2% e 18,2%, respectivamente).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com algumas pesquisas antecedentes no que diz respeito à influência exercida pelos ultra-sons nas concentrações de microcistinas. No estudo realizado por Zhang *et al.* (2006a), foi verificada uma redução instantânea da concentração de microcistinas extracelulares, de cerca de 7,2%, após a sonicação (Sistema sonda: 25 KHz, 80 W e cinco minutos). Os autores atribuíram este decréscimo à potencial degradação impelida pelos ultra-sons. Estes mesmos autores, numa outra experiência laboratorial não verificaram alterações na concentração de microcistinas até cinco minutos de irradiação ultra-sônica para potências inferiores ou iguais a 48 W e uma frequência constante de 80 KHz. Enquanto para uma potência de 80 W, após o mesmo tempo de exposição e frequência, a concentração de microcistinas extracelulares aumentou mais do triplo. Diferentes frequências (20 KHz e 150 KHz) foram também analisadas, mas segundo os autores as diferenças resultantes foram mínimas (Zhang *et al.*, 2006b).

Uma pesquisa efectuada por Ma *et al.* (2005) reforçou ainda que a degradação de microcistinas em suspensões de *Microcystis* spp. depende dos vários parâmetros ultra-sônicos e do tipo de gerador de ultra-sons aplicados. Segundo estes autores, a frequência de 150 KHz, de um conjunto de frequências estudadas de 20 KHz, 410 KHz e 1,7 MHz, para uma potência fixa de 30 W e um tempo de exposição de 20 minutos num sistema de sonda, representa a frequência óptima para a ocorrência de degradação de microcistinas dissolvidas na água, correspondendo a uma redução percentual de 70,6%. Também averiguaram que apenas cinco minutos de irradiação ultra-sônica, para uma frequência de 20 KHz e diferentes potências (0 W, 30 W, 60 W e 90 W), num sistema de banho de ultra-sons, não contribuíram para o aumento de microcistinas extracelulares, excepto para as potências de 60 W e 90 W, para as quais se verificou um acréscimo de 12% e 4%, respectivamente. Adicionalmente, os autores analisaram a influência da concentração de microcistinas inicial nas soluções sobre a dinâmica da respectiva degradação, o que permitiu verificar ocorrer uma velocidade de degradação de microcistinas superior para soluções com concentrações inferiores de microcistinas. Similarmente, Lee *et al.* (2001) concluíram que a irradiação ultra-sônica aplicada a suspensões de *M. aeruginosa* não causa a libertação de toxinas para a água, para uma frequência de 28 KHz e uma potência de 1200 W (banho de ultra-sons), até um período de exposição de cinco minutos.

Embora estes estudos possam parecer contraditórios com os resultados obtidos no presente trabalho, quanto ao tempo de exposição de cinco minutos não induzir o aumento de

microcistinas extracelulares, é necessário ter em consideração que os sistemas de ultra-sons utilizados foram diferentes. Os geradores de sonda ultra-sónica oferecem um melhor desempenho para potências baixas combinadas com frequências intermédias relativamente aos geradores de banho. Nestes últimos, há uma maior dispersão de energia nos sistemas reaccionais e, por isso, a influência exercida pela irradiação ultra-sónica no meio irradiado é inferior comparativamente aos sistemas sonda.

Contudo, a capacidade que os ultra-sons demonstram na degradação de microcistinas tem suscitado o desenvolvimento de estudos de maior complexidade. Por exemplo, Song *et al.* (2006) concluíram que as duas variantes de microcistinas, MC-LR e MC-RR, são degradadas pelos efeitos sonoquímicos, nomeadamente pela acção de radicais livres produzidos durante a cavitação (Sistema sonda: 640 KHz, 500 W e 135 minutos). Os resultados desta pesquisa evidenciaram existir uma acção dos radicais OH^\bullet tanto sobre o anel benzeno como sobre o dieno do resíduo péptido Adda, bem como na clivagem da ligação péptida Mdha-Ala, compostos constituintes das microcistinas. Para a MC-LR ainda constataram uma degradação mais favorável sob condições ácidas, correlacionada com a alteração do carácter hidrofóbico da variante em função do pH.

4.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA PARA OS DIFERENTES ENSAIOS COM ULTRA-SONS

Os resultados da avaliação morfológica das colónias *Microcystis* spp., antes e após a exposição aos ultra-sons são apresentados por ensaio e seguidamente comparados.

4.3.1 Ensaio 1: Frequência de 35 KHz e amplitude de 20%

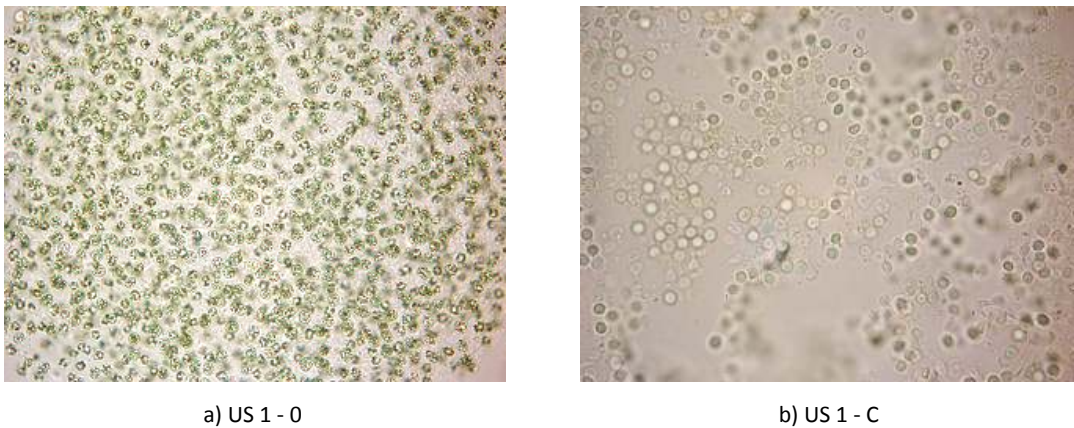
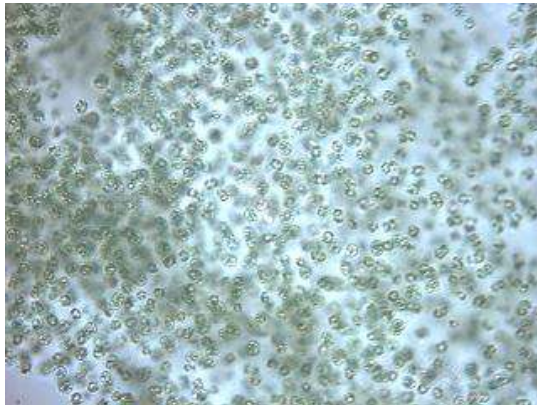


Figura 4.3.1. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp. na a) amostra controlo (US 1 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 1 - C), para uma resolução de 100x.

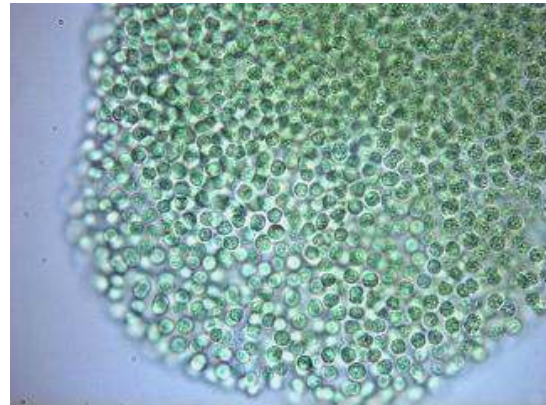
As amostras utilizadas no Ensaio 1 mostraram inúmeras colónias de *Microcystis* spp. de pequena e média dimensão (Figura 4.3.1.1a). Na amostra submetida à sonicação (US 1 - C), a maioria das colónias de *Microcystis* spp. observadas não apresentavam qualquer alteração. Todavia, algumas colónias de pequena dimensão encontravam-se afectadas, com as células individuais a exibirem uma coloração verde mais clara e alguma dispersão (Figura 4.3.1.1b).

Nas mesmas amostras foi encontrada uma quantidade apreciável de algas verdes do género *Scenedesmus* spp. que não aparentaram qualquer alteração quando submetidos aos ultra-sons.

4.3.2 Ensaio 2: Frequência de 35 KHz e amplitude de 50%



a) US 2 - 0

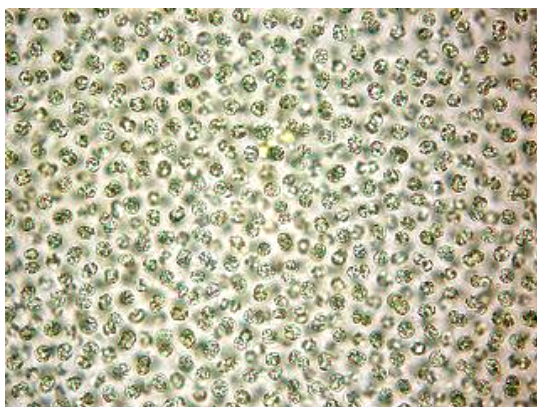


b) US 2 - C

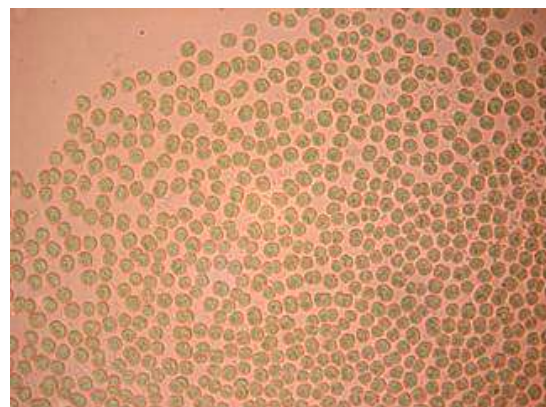
Figura 4.3.2. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp. na a) amostra controlo (US 2 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 2 - C), para uma resolução de 100x.

No Ensaio 2, a amostra exposta aos ultra-sons (US 2 - C) apresentava diversas colónias de *Microcystis* spp. parcialmente afectadas e algumas, de maiores dimensões, sem qualquer alteração. Como ilustra a Figura 4.3.2.1b, as células periféricas das colónias apresentaram uma maior alteração na sua organização celular, evidenciando uma cor verde mais clara (menor pigmentação) comparativamente às células do controlo (Figura 4.3.2.1a).

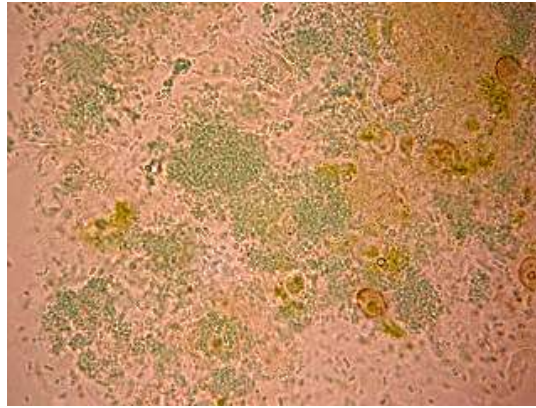
4.3.3 Ensaio 3: Frequência de 35 KHz e amplitude de 100%



a) US 3 - 0



b) US 3 - C



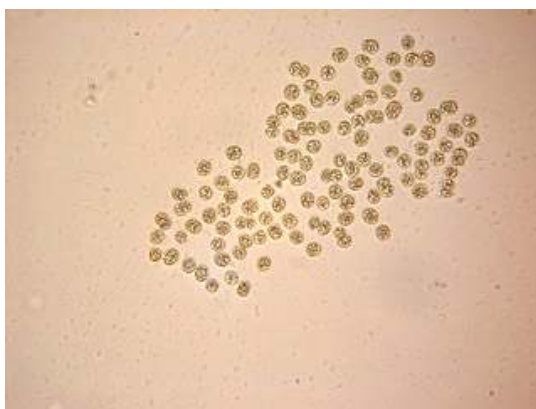
c) US 3 - C

Figura 4.3.3. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp na a) amostra controle (US 3 - 0) e b) e c) amostra submetida aos ultra-sons (US 3 – C), para uma resolução de 100x.

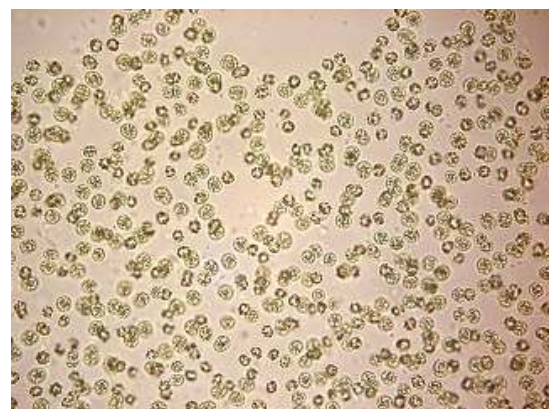
Com uma frequência de 35 KHz e uma amplitude 100%, os efeitos dos ultra-sons na organização celular da *Microcystis* spp. foram bastante acentuados. Tal como ilustra a Figura 4.3.3.1b, as células apresentaram uma desorganização celular perceptível, após a sonicação, caracterizada por uma coloração homogênea, verde-clara, no interior das células, não evidenciando a presença de organelos celulares comparativamente às células controle. Adicionalmente, a amostra submetida aos ultra-sons revelou a presença de uma quantidade expressiva de organelos celulares dispersos. (Figura 4.3.3.1c).

Além de colônias de *Microcystis* spp., ambas as amostras continham alguns aglomerados de algas verdes, que após a sonicação não apresentaram alterações morfológicas.

4.3.4 Ensaio 4: Frequência de 130 KHz e amplitude de 20%



a) US 4 - 0

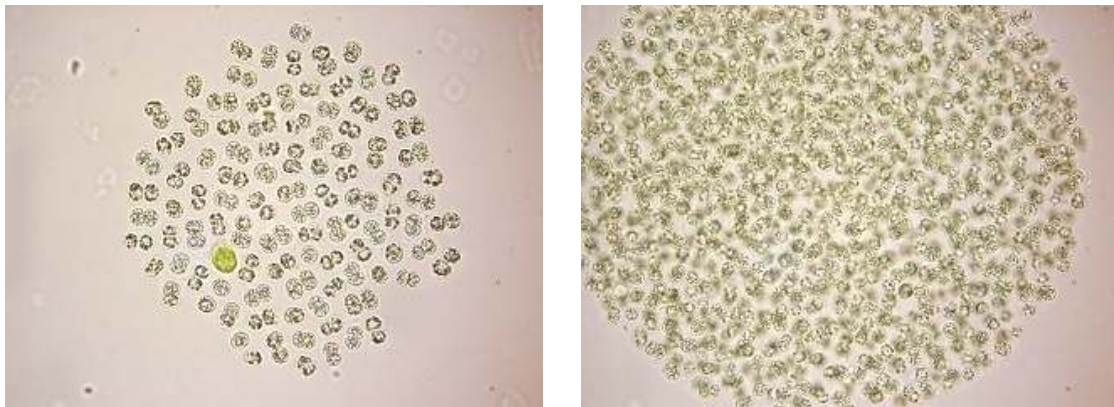


b) US 4 - C

Figura 4.3.4. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp na a) amostra controle (US 4 - 0) e b) e c) amostra submetida aos ultra-sons (US 4 – C), para uma resolução de 100x.

No Ensaio 4 verificou-se existir uma quantidade reduzida de colónias de *Microcystis* spp. presentes nas amostras, todas de pequena dimensão (Figura 4.3.4.1a), e uma quantidade significativa de algas verdes. A amostra submetida aos ultra-sons (US 4 - C) apresentou algumas colónias desagregadas e algumas células em aglomerados de algas verdes, aparentemente sem qualquer efeito causado pelos ultra-sons (Figura 4.3.4.1b).

4.3.5 Ensaio 5: Frequência de 130 KHz e amplitude de 50%



a) US 5 - 0

b) US 5 - C

Figura 4.3.5. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp na a) amostra controlo (US 5 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 5 – C), para uma resolução de 100x.

No Ensaio 5 não foram verificadas alterações de grande magnitude nas colónias de *Microcystis* spp. As colónias após submissão aos ultra-sons mostraram apenas uma ligeira variação ao nível da cor das células constituintes (Figura 4.3.5.1b).

4.3.6 Ensaio 6: Frequência de 130 KHz e amplitude de 100%

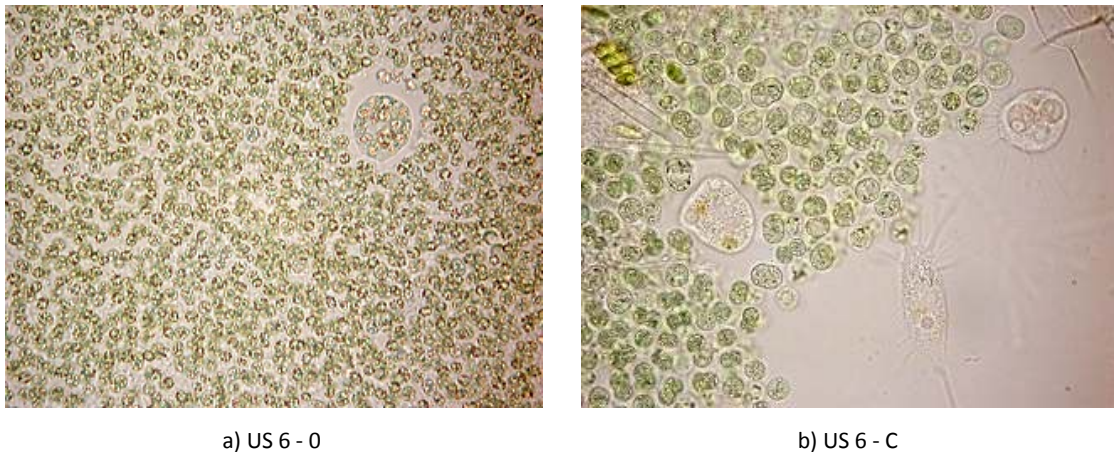


Figura 4.3.6. 1 – Observação microscópica da *Microcystis* spp na a) amostra controlo (US 6 - 0) e b) amostra submetida aos ultra-sons (US 6 – C), para uma resolução de 100x.

Como pode ser observado nas Figura 4.3.6.1b, verificou-se um aumento significativo do tamanho das células de *Microcystis* spp. após a exposição aos ultra-sons. Ao nível da organização celular, o citoplasma das células apresentou-se com uma pigmentação menos intensa que as células controlo. No entanto, os organelos celulares permaneceram nítidos na maioria das células submetidas aos ultra-sons.

Observou-se uma quantidade apreciável de *Scenedemus* spp. nas culturas utilizadas e após a sonicação alguns destes organismos apresentaram alterações significativas. Nas mesmas culturas foi notória a presença de organelos celulares (cor verde) dispersos no meio; na amostra de controlo estes mesmos organelos foram observados, mas numa menor proporção.

Na Figura 4.3.6.1b também é possível observar outros microrganismos, além de células de *Microcystis* spp., que se suspeita serem protozoários. Através da observação microscópica da amostra controlo e da amostra submetida aos ultra-sons, não foram detectadas quaisquer alterações na morfologia destes microrganismos.

4.3.7 Comparação morfológica entre os vários ensaios

De entre os vários ensaios, foi no Ensaio 3 que as colónias de *Microcystis* spp. presentes mostraram alterações de maior magnitude na sua organização celular quando submetidas ao banho de ultra-sons, durante cinco minutos. No mesmo Ensaio 3 (35 KHz e 100%) tinha já sido observada uma maior redução em clorofila *a*, bem como de microcistinas intracelulares. As observações microscópicas dos ensaios 1, 5 e 6 foram igualmente concordantes com as relativas às concentrações de clorofila *a* e microcistinas intracelulares. Nos dois primeiros, as pequenas variações constatadas nas colónias de *Microcystis* spp. são concordantes com a redução pouco acentuada das concentrações dos dois parâmetros bióticos, comparativamente aos restantes ensaios. No caso particular do Ensaio 6, a subsistência da organização celular após a sonicação pode explicar a reduzida concentração de microcistinas intracelulares libertadas para o meio solúvel. O aumento do tamanho das células de *Microcystis* spp., causado pela cavitação acústica, neste mesmo ensaio, foi igualmente observado por Chi *et al.* (2003).

Em termos morfológicos, o Ensaio 2 demonstrou maiores alterações ao nível da organização celular das colónias *Microcystis* spp. relativamente ao Ensaio 4. Porém, os valores obtidos para a clorofila *a* e microcistinas intracelulares não foram concordantes.

Relativamente aos efeitos adversos dos ultra-sons sob outros microrganismos, apenas foram detectadas algumas alterações morfológicas na espécie *Scenedesmus* spp. para a frequência e amplitude mais elevadas (Ensaio 6).

4.4 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS APÓS SONICAÇÃO

A recuperação do crescimento das cianobactérias foi avaliada durante os 14 dias subsequentes à sonicação.

Realça-se o facto da absorvância medida não respeitar apenas à cultura de *Microcystis* spp., uma vez que se utilizaram culturas mistas. Deste modo, os resultados obtidos para a densidade óptica respeitaram a uma avaliação global do crescimento dos microrganismos presentes (algas verdes, por exemplo) e não especificamente do crescimento de *Microcystis* spp.

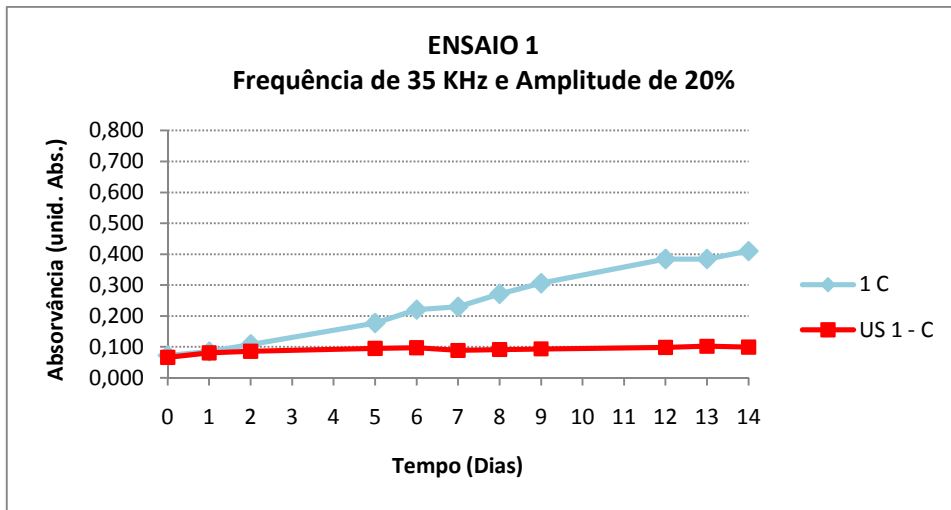


Figura 4.4. 1 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 1 (35 KHz e 20%).

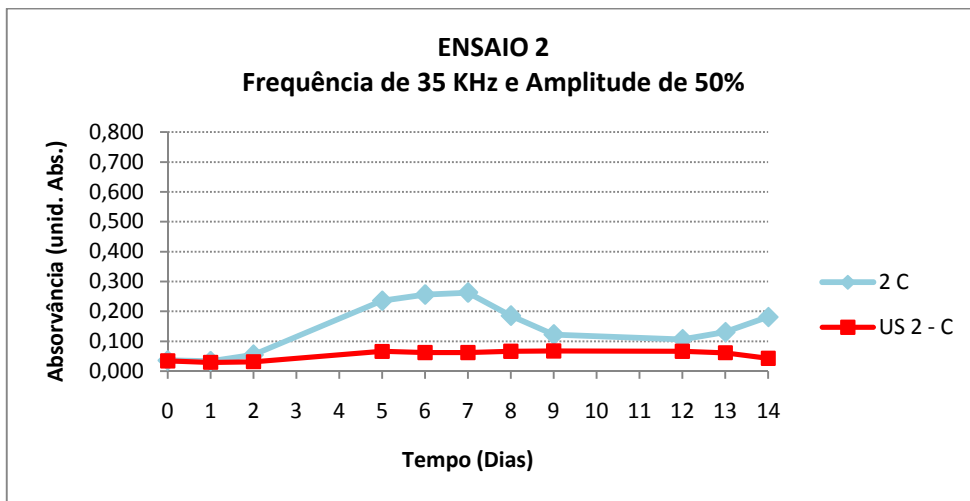


Figura 4.4. 2 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 2 (35 KHz e 50%).

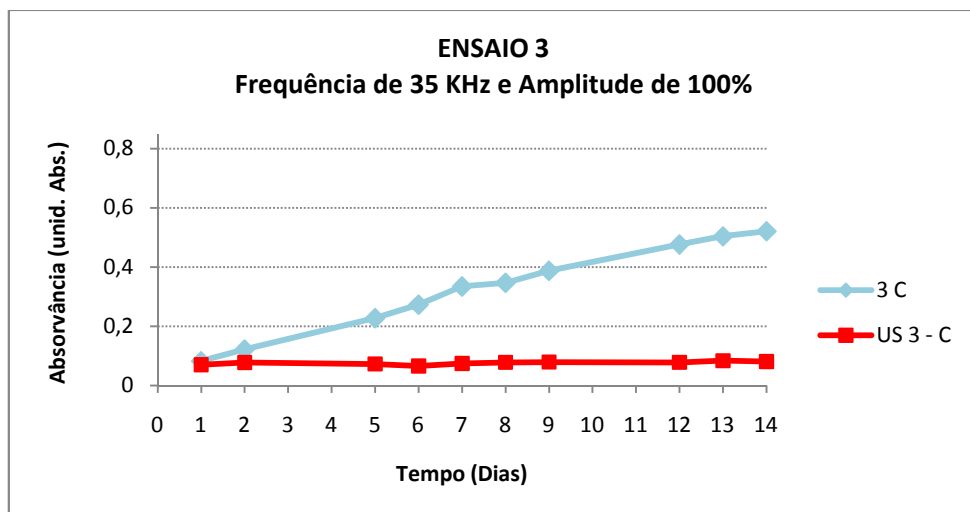


Figura 4.4. 3 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 3 (35 KHz e 100%).

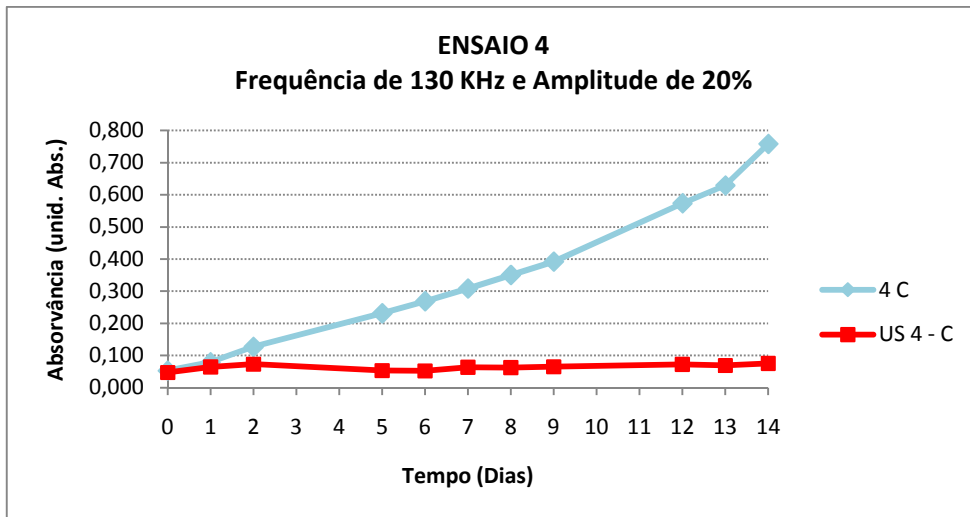


Figura 4.4. 4 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 4 (130 KHz e 20%).

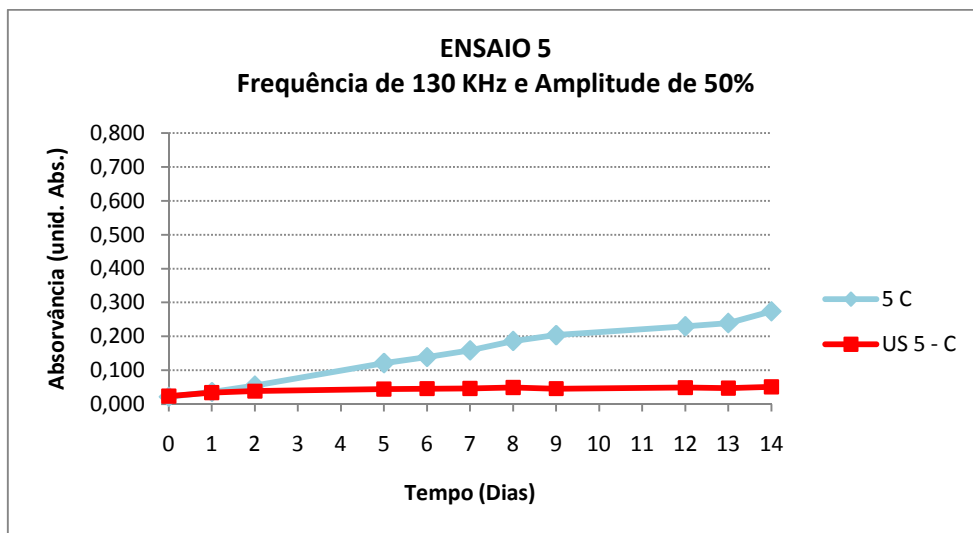


Figura 4.4. 5 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 5 (130 KHz e 50%).

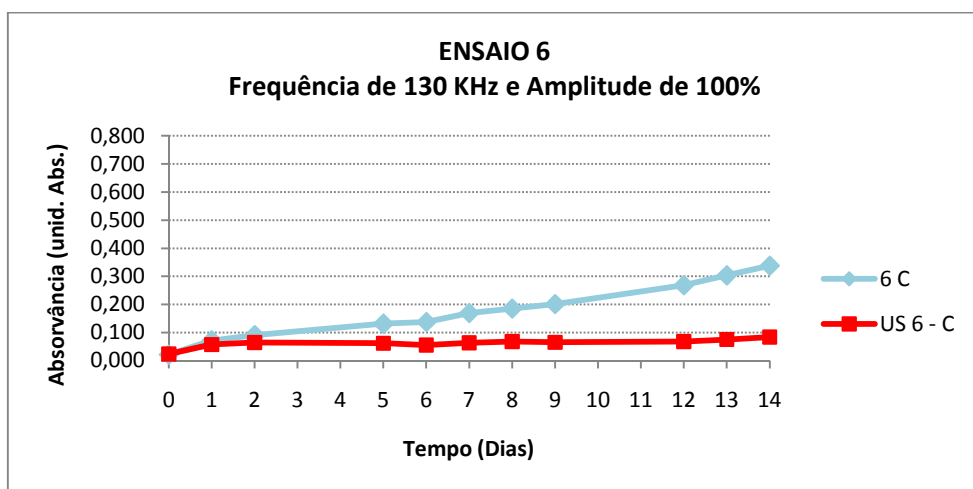


Figura 4.4. 6 – Avaliação do crescimento durante 14 dias do Ensaio 6 (130 KHz e 100%).

Uma inibição do crescimento das culturas submetidas à sonicação foi observada na totalidade dos ensaios (Figuras 4.4.1 – 4.4.6).

No Ensaio 3, os valores medidos em cada uma das amostras (3C e US 3 – C) para o *dia 0* não são consistentes com os restantes pelo que se considerou terem derivado de um erro do operador, não sendo considerados.

A diminuição da biomassa ocorreu a partir das primeiras 24 horas após a sonicação, em todos os ensaios, com valores percentuais de 4,2% (Ensaio 5) a 20,1 % (Ensaio 6).

Diferenças significativas entre as amostras controlo (xC) e sonicada (USx - C) observaram-se a partir do *dia 5*. A maior inibição do crescimento nas culturas submetidas aos ultra-sons foi observada no Ensaio 4, equivalente a uma percentagem de redução de 77,1%, ao contrário do Ensaio 1 com apenas uma percentagem de cerca de 46,3%.

No final do período de avaliação, as percentagens de inibição do crescimento oscilaram entre 75,2% (Ensaio 6) e 90% (Ensaio 4) (Quadro 4.4.1). No Ensaio 2, a inibição do crescimento nas culturas foi contabilizada apenas até ao *dia 7*, a partir do qual se constatou o início de uma fase de senescência das cianobactérias, com recuperação após o *dia 12*.

Quadro 4.4. 1 – Percentagens de inibição do crescimento após 14 dias da sonicação, de redução das concentrações de clorofila *a* e de microcistinas intracelulares para cada ensaio.

	% Inibição do crescimento	% Redução de clorofila <i>a</i>	% Redução de microcistinas intracelulares
Ensaio 1	75,9	5,3	6,0
Ensaio 2	76,2*	5,0	29,6
Ensaio 3	84,5	60,5	49,3
Ensaio 4	90,0	43,3	40,1
Ensaio 5	81,4	2,9	26,2
Ensaio 6	75,2	-	5,0

*Após 7 dias da sonicação.

O Quadro 4.4.1 permite verificar que nos ensaios 3 e 4 se obtiveram maiores inibições na taxa de crescimento, com valores percentuais de 84,5% e 90,0%, respectivamente, valores concordantes com as reduções mais elevadas das concentrações de clorofila *a* e microcistinas intracelulares observadas nos mesmos ensaios, apesar da percentagem mais elevada de redução destes parâmetros se ter obtido no Ensaio 3. De facto, na cultura utilizada para o Ensaio 4 constatou-se uma dominância de algas verdes que podem ter enfatizado os efeitos dos ultra-sons na *Microcystis* spp. e, previsivelmente, ter contribuído para um decréscimo mais acentuado do respectivo crescimento.

Apesar de esta avaliação não representar exclusivamente a densidade celular da *Microcystis* spp., foi possível verificar microscopicamente outros microrganismos nas culturas aparentemente sem qualquer efeito causado pelos ultra-sons. Nas culturas dos ensaios 1, 5 e 6 foi verificada uma quantidade considerável de *Scenedesmus* spp., que somente no Ensaio 6 evidenciaram algumas alterações morfológicas. Neste sentido, seria expectável uma maior redução da taxa de crescimento de microrganismos no Ensaio 6 e menores nos restantes ensaios, principalmente nos ensaios 3 e 4 (com algas verdes). Deste modo, pode-se assumir que a avaliação da inibição do crescimento da *Microcystis* spp. traduziu efectivamente o desenvolvimento celular da espécie.

A capacidade de a irradiação ultra-sónica inibir o crescimento de cianobactérias, essencialmente de *Microcystis* spp., tem sido descrita em vários trabalhos anteriormente mencionados. De uma forma geral, os estudos demonstraram uma redução da taxa de crescimento das cianobactérias, instantânea e/ou a longo prazo, posterior à sonicação, reforçando os decréscimos obtidos para os vários parâmetros, como as concentrações de clorofila *a* (Lee *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006a, 2006b), de microcistinas intracelulares (Lee *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005) e a actividade fotossintética (Lee *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006a). Porém, é necessário realçar que a inibição do crescimento verificada nas diversas pesquisas efectuadas foi obtida por aplicação de diferentes metodologias.

Resultados similares aos do presente trabalho foram obtidos por Zhang *et al.* (2006a), com 85,9% de inibição do crescimento da *Microcystis aeruginosa* 14 dias após a sonicação (Sistema sonda: 25 KHz; 80 W; cinco minutos). Por outro lado, na pesquisa efectuada por Chi *et al.* (2003), a densidade celular indicou uma retoma do crescimento pouco depois da interrupção da sonicação (Sistema sonda: 20 KHz, 600 W e dois minutos), executada duas vezes por dia durante seis dias.

Em termos instantâneos, ambas as pesquisas de Lee *et al.* (2001) e Ma *et al.* (2005) evidenciaram reduções significativas no crescimento de *Microcystis* spp. A título de exemplo, com apenas 3 s de sonicação (Sistema banho: 28 KHz e 120 W), Lee *et al.* (2001) verificaram uma sedimentação das suspensões de *Microcystis* spp. na ordem dos 80%. No entanto, outra abordagem, efectuada por Tang *et al.* (2004), verificou não existir uma inibição efectiva do crescimento da *M. aeruginosa* para uma frequência de 1,7 MHz, potência de 0,6 W/cm² e para um tempo de exposição de cinco minutos. Em apenas 24 horas depois da sonicação os autores observaram a recuperação do crescimento da espécie.

Face aos parâmetros ultra-sónicos seleccionados nos vários estudos mencionados e no presente trabalho, é possível verificar que a combinação de frequências baixas (25 KHz a 35 KHz) com potências intermédias (80 W a 500 W), para um tempo de exposição de cerca de cinco minutos, resulta numa maior afectação a longo prazo de *Microcystis* spp.. Todavia, é evidente que os efeitos induzidos pela cavitação acústica, para além dos parâmetros ultra-sónicos seleccionados, também são condicionados pelos sistemas utilizados, banho ou sonda, e pela sensibilidade das espécies ao processo.

Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o potencial da irradiação ultra-sónica na redução efectiva da taxa de crescimento de *Microcystis* spp. através do provável colapso das vesículas gasosas e consequente perda da capacidade de flutuação das células, provocando a respectiva sedimentação. Lee *et al.* (2001) confirmaram o colapso imediato dos vacúolos gasosos das células de *Microcystis* spp. por microscopia electrónica de transmissão (TEM).

De facto, na totalidade dos ensaios aqui apresentados verificou-se uma deposição gradual de partículas no fundo dos recipientes de cada amostra submetida aos ultra-sons, tornando a amostra mais límpida comparativamente às respectivas amostras controlo. Por sua vez, as amostras controlo evidenciaram uma cor verde progressivamente mais escura até ao final do período de avaliação, indicadora de uma produtividade contínua. Na Figura 4.4.7 podem-se observar as amostras controlo (xC) e sonicadas (USx-C) de cada ensaio 14 dias após a sonicação.



a)



b)



c)



d)



e)



f)

Figura 4.4. 7 – Amostras controlo (xC) e sonicada (USx-C) após 14 dias de avaliação do crescimento dos ensaios: a) Ensaio 1 (35KHz e 20%); b) Ensaio 2 (35 KHz e 50%); c) Ensaio 3 (35 KHz e 100%); d) Ensaio 4 (130 KHz e 20%); e) Ensaio 5 (130 KHz e 50%); f) Ensaio 6 (130 KHz e 100%).

Ao contrário do referido por algumas pesquisas, a coloração das amostras submetidas aos ultra-sons não evidenciou quaisquer alterações imediatas. A composição mista das culturas utilizadas pode ter dissimulado tais alterações, visto ter sido pouco significativo, ou mesmo nulo, o efeito da irradiação ultra-sónica sobre outros microrganismos presentes nas culturas. Contrariamente, nas duas abordagens efectuadas por Zhang *et al.* (2006), foi observada uma descoloração instantânea em culturas puras de *Microcystis* spp. após cinco minutos de irradiação ultra-sónica.

5. CONCLUSÃO

A irradiação ultra-sónica foi avaliada à escala laboratorial com recurso a um sistema de banho como uma alternativa possível de controlar *blooms* de cianobactérias.

Os mecanismos de inibição ao desenvolvimento das cianobactérias podem ser atribuídos à cavitação ultra-sónica transitória que, por sua vez, depende fortemente da frequência e amplitude (potência), assim como do sistema de ultra-sons. Dos diferentes parâmetros seleccionados para um tempo de exposição fixo de cinco minutos, a frequência de 35 KHz associada à amplitude de 100% (equivalente a 500 W) representaram os parâmetros mais adequados para a inibição do crescimento das espécies, aproximadamente 84,5% (Ensaio 3). Apesar dos restantes ensaios, à excepção do Ensaio 4, apresentarem menores inibições de crescimento, é de realçar que as respectivas taxas de redução foram igualmente significativas, superiores a 75%. No caso particular do Ensaio 4 (130 KHz e 20%, equivalente a 100 W), associado ao registo da redução mais elevada do crescimento, a presença dominante de algas verdes pode ter contribuído para o efeito. Deste modo, assumiu-se que o Ensaio 3, anteriormente referido, teve um melhor desempenho em termos de inibição do crescimento da *Microcystis* spp.

Esta inibição indica uma correlação verosímil com o eventual colapso das vesículas gasosas, constituintes dos vacúolos, quando sujeitas à irradiação ultra-sónica. No campo ultra-sónico, as vesículas gasosas também actuam como bolhas cavitacionais. Quando a acção combinada das pressões hidrostática e ultra-sónica excede a força finita da parede das vesículas gasosas, estas colapsam inviabilizando a capacidade de flutuação das células. Como resultado, a sedimentação das células e a subsequente inibição do crescimento até uma nova geração são inevitáveis. De facto, a perda de flutuabilidade celular da *Microcystis* spp. foi corroborada pela visualização de uma deposição de partículas nas amostras sonicadas, acompanhada pela descoloração das mesmas amostras, durante um período de 14 dias posteriores à sonicação. Esta sedimentação progressiva foi consistente com a ausência de crescimento, presenciado na totalidade dos ensaios.

A energia gerada na cavitação transitória pode traduzir-se em pressões e temperaturas bastantes elevadas, acompanhadas por ondas de choque de alta pressão. Um aumento da temperatura das amostras submetidas aos ultra-sons foi, de facto, verificado nos ensaios cuja frequência utilizada foi de 130 KHz, tendo sido proporcional à amplitude. Esta energia

substancial gerada também pode danificar o material celular circundante às vesículas gasosas. A cedência da parede celular e a destruição de pigmentos fotossintéticos, como a clorofila *a*, são duas consequências plausíveis da aplicação dos ultra-sons sobre as cianobactérias. Estes dois eventos foram confirmados em alguns dos ensaios, ou mesmo na sua totalidade.

A observação microscópica das colónias de *Microcystis* spp. permitiu confirmar alguma irregularidade das superfícies celulares nos ensaios 2, 3 e, principalmente, no ensaio 6, após submissão aos ultra-sons. No último ensaio, as alterações causadas pela irradiação ultra-sónica incidiram sobretudo na expansão intracelular, sem qualquer efeito aparente sobre a parede celular das células. Nos ensaios 2 e 3, e sobretudo neste último, para além de uma certa irregularidade na forma básica das células, o conteúdo intracelular apresentou-se homogéneo e sem pigmentação. A homogeneidade verificada nas células reforça a provável destruição dos pigmentos fotossintéticos, para além de outros organelos celulares, como efeito da acção dos ultra-sons. De facto, o Ensaio 3 foi representativo de uma maior redução da concentração de clorofila *a* (60,5%), igualmente consistente com a maior inibição do crescimento obtida, uma vez que a clorofila *a* é um pigmento fotossintético indispensável à sobrevivência das cianobactérias.

A subsistência do material intracelular nas células de *Microcystis* spp. observada no Ensaio 6 (130 KHz e 100% equivalente a 500W), após exposição ultra-sónica, também foi concordante com a menor taxa de crescimento detectada. Apesar da incoerência do resultado obtido para a concentração clorofila *a*, e tendo em consideração a tendência dos resultados de todos os ensaios para este parâmetro, seria expectável a mesma conformidade entre os vários parâmetros respeitantes ao Ensaio 6. Amplitudes de 20% (100 W) e 50% (250 W), para ambas as frequências adoptadas, desempenharam um papel menos eficaz na destruição imediata da clorofila *a* que se traduziu em menores taxas de inibição do crescimento a longo prazo (ensaios 1, 2, 5 e 6). Deste modo, é possível verificar existir uma correlação positiva entre as concentrações de clorofila *a* e a inibição do crescimento.

As alterações provocadas pelos ultra-sons sobre a actividade fotossintética, assim como sobre as membranas celulares, resultam da produção de radicais livres de enorme potencial oxidante. Contrariamente ao que seria esperado, devido à presença desses radicais altamente oxidantes, os teores de oxigénio dissolvido (OD) e o pH das amostras submetidas aos ultra-sons sofreram um aumento instantâneo, ainda considerável no caso do OD. Quatro

explicações plausíveis para tal facto resumem-se a erros experimentais, ou à agitação provocada pelo processo de irradiação, ou à ocorrência reduzida de reacções oxidativas imediatas, possivelmente justificada pelo tempo de exposição insuficiente, ou pela capacidade de defesa antioxidante das cianobactérias. Porém, a inibição efectiva do crescimento pode sugerir uma ocorrência posterior de reacções oxidativas nas culturas, afectando provavelmente a permeabilidade passiva das membranas, os processos de transporte activo e as taxas metabólicas das cianobactérias.

Quanto ao parâmetro abiótico de turvação concluiu-se que o aumento da irradiação ultra-sónica foi proporcional à redução do parâmetro. Os resultados para a turvação não evidenciaram uma relação estritamente directa com a remoção ou sedimentação das cianobactérias, visto que maiores reduções de turvação não corresponderam a maiores taxas de inibição do crescimento, assim como de concentrações de clorofila *a*.

Além da remoção e inibição de crescimento de cianobactérias, a irradiação ultra-sónica parece ter um papel importante na degradação de microcistinas solubilizadas em meios contendo *Microcystis* spp. Este facto foi aparentemente reconhecido nos ensaios 2, 3 e 6, nos quais foi apurada uma redução de microcistinas extracelulares superior à quantidade de microcistinas intracelulares libertadas para o meio solúvel. Os ensaios 3 e 6 levaram a uma maior degradação de microcistinas extracelulares, na ordem dos 30%, contra 6,4%, aproximadamente, no Ensaio 2. No entanto, é de salientar que cinco minutos de irradiação ultra-sónica induziram aumentos significativos de microcistinas extracelulares na ordem dos 93% a 202% para a frequência 130KHz associada às amplitudes de 20% (100 W) e 50% (250 W), respectivamente (ensaios 4 e 5). Por outro lado, a combinação da frequência e amplitude mais altas (Ensaio 6) demonstrou ter uma influência pouco significativa no incremento da concentração de microcistinas extracelulares (6,0%, aproximadamente). A alteração das células de *Microcystis* spp. observada por microscopia, assim como as taxas de crescimento correspondentes reforçam a influência pouco expressiva da irradiação ultra-sónica sobre a libertação de microcistinas.

Em suma, é possível concluir que a tecnologia ultra-sónica aplicada no presente trabalho constituiu um método eficiente para a inibição do crescimento da espécie *Microcystis* spp., sendo a selecção dos parâmetros frequência e amplitude de extrema importância. De acordo com os resultados obtidos, uma frequência mais baixa (35 KHz) associada a uma amplitude/potência mais alta (100% / 500 W), para um tempo de exposição de cinco

minutos, induzem maiores efeitos inibitórios no desenvolvimento da *Microcystis* spp. No entanto, a frequência mais alta (130 KHz) aliada à maior amplitude/potência (100% / 500 W), para o mesmo tempo de exposição, revelaram ser os parâmetros mais adequados no que respeita às concentrações de microcistinas, visto que não induziram uma libertação significativa de microcistinas para o meio solúvel e evidenciaram uma certa capacidade de degradação das microcistinas extracelulares.

Contudo, o tempo limitado para a realização do presente trabalho não possibilitou o estudo de outras variáveis fundamentais à confirmação dos resultados auferidos. Face ao exposto, algumas recomendações são seguidamente descritas:

- Estudo da influência do tempo de exposição - períodos de tempo mais curtos e maiores;
- Estudo da interferência de amplitudes ou potências mais baixas e mais altas e para diferentes sistemas de ultra-sons (banho e sonda);
- Estudo da sensibilidade de outras espécies de cianobactérias face a irradiação ultra-sônica;
- Estudo da fase de crescimento de maior sensibilidade à irradiação ultra-sônica;
- Avaliação contínua dos parâmetros oxigénio dissolvido, turvação, clorofila *a* e microcistinas, paralela à avaliação do crescimento, assim como os parâmetros de carbono orgânico total (COT) e sólidos suspensos totais (SST);
- Avaliação da produção de radicais livres induzida pela irradiação ultra-sônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTRAM, J.; CARMICHAEL, W. W.; CHORUS, I.; JONES, G.; SKULBERG, O. M. 1999. *Introduction*. In CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Great Britain: St Edmundsbury Press. ISBN 978-0-419-23930-7. p.12-22;

BELENKY, M.; MEYERS, R.; HERZFELD, J 2004. *Subunit Structure of Gas Vesicle: A MALDI-TOF Mass Spectrometry Study*. *Biophysical Journal*. Bethesda: Biophysical Society. ISSN 0006-3495. 8:1 p. 499-505;

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. 1985. *Introduction to the algae, structure and reproductions*. Second ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc. ISBN 0-13-477746-8. p. 1-34;

CARMICHAEL W. W. 1992. *Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins*. *Journal of applied bacteriology*. Oxford: Blackwell. ISSN 0021-8847. 72:6 445-459;

CHI, Y. A.; MYUNG, H. P.; SEUNG, H. J.; HEE, S. K.; KAM, Y. J.; HEE, M. O. 2003. *Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies*. *Environmental science and technology*. Washington: American Chemical Society. ISSN 0013-936X. 37:13 3031-3037;

CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A. 2002. *Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins*. *Aquatic Microbial Ecology*. Oldendorf: Inter Research. ISSN 0948- 3055. 27:2 125-136;

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Ed. American Public Health – American Water Works Association – Water Environment Federation;

CODD, G. A.; LINDSAY, J.; YOUNG, F. M.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. 2005. *Harmful cyanobacteria: From mass mortalities to management measures*. In Huisman, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M. *Aquatic Ecology*. Netherlands: Springer. ISBN 978-1-402-03009-3. 3 vol. p. 1-23;

Cyanobacterial Toxins – Microcystin-LR. Ontario: Ministry of the Environment, 2009. [Consult. 27 Ag. 2009]. Disponível em WWW: <URL: http://www.ene.gov.on.ca/envision/env_reg/er/documents/2003/PA03E0001.pdf

DUNN, F. 1982. *Selected biological effects of ultrasound*. In REPACHOLI, M. H.; BENWELL, D. A. *Essentials of medical ultrasound: a practical introduction to the principles, techniques, and biomedical applications*. 1 ed. Clifton: Humana Press. ISBN 978-0-896-03028-2. p. 117-140;

EEA (European Environment Agency) 2005. *The European environment – State and outlook 2005*. Technical report N° 1. Copenhagen: EEA. ISBN 92-9167-776-0. p 324-348.

Elma GmbH & Co. KG. 2009. Kolpingstr: Ultraschall. [Consult. 23 Ab. 2009]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.elma-ultrasonic.com/TI-H-5.345.0.html?&L=1>>

FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. 2005. *Health risk assessment of cyanobacterial (blue green algal) toxins in drinking water*. *International journal of environmental research and public health*. Molecular Diversity Preservation International. ISSN 1660-4601. 2:1 43-50;

FALCONER, I.; BARTRAM, J.; CHORUS, I.; GOODMAN, T. K.; UTKILEN, H.; BURCH, M.; CODD, G. A. 1999. *Safe levels and safe practices*. In CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Great Britain: St Edmundsbury Press. ISBN 978-0-419-23930-7. p. 161-182;

FIGUEIREDO, D. R. de; AZEITEIRO, U. M.; ESTEVES, S. M.; GONÇALVES, F. J. M.; PEREIRA, M. J. 2004. *Microcystin-producing blooms: a serious global public health issue*. *Ecotoxicology and environmental safety*. San Diego: Elsevier Science. ISSN 0147-6513. 59:2 151-163;

- FONSECA, R. M. F. da 2002. *Impactos ambientais associados a barragens e a albufeiras. Estratégia de re-aproveitamento dos sedimentos depositados*. In SILVA, A. M. A.; ARAÚJO, A. A.; BEZZEGHOUD, M.; ROSA, R. N.; SALGADO, R. *Dams: Impacts and Hazards*. Évora: Centro de Geofísica de Évora. [Consult. 14 Ag. 2009]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.cge.uevora.pt/dams/proceedings-dams.pdf>>
- HAO, H.; WU, M.; CHEN, Y.; TANG, J.; WU, Q. 2004a. *Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation*. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0927-7765. 33:3-4 151-156;
- HAO, H.; WU, M.; CHEN, Y.; TANG, J.; WU, Q. 2004b. *Cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation at 20 KHz and 1.7 MHz*. *Journal of environmental science and health: Part A – Toxic/Hazardous substances and environmental engineering*. Philadelphia: Taylor & Francis. ISSN 1093-4529. 39:6 1435-1446;
- HENG, L.; JUN, N.; WEN-JIE, H.; GUIBAI, L. 2009. *Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation*. *Desalination*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 001-9164. 239:1-3 191-197;
- HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. 1995. *Algae – An introduction to phycology*. 1ª ed. New York: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-31687-3. p. 16-39;
- INCE, N.H.; TEZCANLI, G.; BELEN, R.K.; APIKYAN, I.G. 2001. *Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications*. *Applied Catalysis B: Environmental*. Elsevier Science. ISSN 0926-3373. 29:3 167-176;
- JANG, M.; HA, K.; LUCAS, M. C.; JOO, G.; TAKAMURA, N. 2004. *Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish*. *Aquatic toxicology*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0166-445X. 68:1 51-59;
- KAMOGÉ, M.; HIROOKA, E. Y. 2000. *Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas*. *Acta Scientiarum*. Maringá. ISSN 1415-6814. 22:5 1189-1200;

KING, Dr. M. L. 2001. *Creating a Cyanotoxin Target List for the Unregulated Contaminant Monitoring Rule. Meeting Summary*. Cincinnati: USEPA. [Consult. 5 Jun. 2009]. Disponível em WWW: <URL: http://www.epa.gov/safewater/ucmr/pdfs/meeting_ucmr1_may2001.pdf>;

KNAPPE, D. R. U., ed. lit.; BELK, R. C., ed. lit.; AWWA Research Foundation; BARILEY, D., ed. lit.; GANDY, S.; RASTOGI, N. 2004. *Algae detection and removal strategies for drinking water treatment plants*. U.S.A: American Water Works Association. ISBN 978-1-583-21307-0. p. 3-30;

LAM, A. K. Y.; PREPAS, E. E.; SPINK, D.; HRUDEY, S. E. 1995. *Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. Water research*. Oxford: Elsevier Science. ISSN 0043-1354. 29:8 1845-1854;

LEE, T. J.; NAKANO, K.; MATSUMARA, M. 2001. *Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control. Environmental technology*. Abingdon: Taylor & Francis. ISSN 0959-3330. 22:4 383-390;

LEE, T. J.; NAKANO, K.; MATSUMARA, M. 2002. *A novel strategy for cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation. Water science and technology*. London: IWA. ISSN 0273-1223. 46:6-7 207-215;

LI, X.; CHUNG, I.; KIM, J.; LEE, J. 2004. *Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. Toxicon*. Oxford: Elsevier Science. ISSN 0041-0101. 44:8 821-827;

MA, B.; CHEN, Y.; HAO, H.; WU, M.; WANG, B.; LV, H.; ZHANG, G. 2005. *Influence of ultrasonic field on microcystin produced by bloom-forming algae. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0927-7765. 41:2-3 197-201;

MAHVI, A. H.; DEGHANI, M. H. 2005. *Evaluation of Ultrasonic Technology in Removal of Algae from Surface Waters. Pakistan Journal of Biological Sciences*. ISSN 1028-8880. 8:10 1457-1459;

MASON, T. J. 1997. *Ultrasound in synthetic organic chemistry*. *Chemical Society reviews*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISSN 0306-0012. 26:6 443-451;

MASON, T. J. 2007a. *Developments in ultrasound – Non-medical*. *Progress in biophysics and molecular biology*. Oxford: Elsevier Science. ISSN 0079-6107. 93:1-3 166-175;

MASON, T. J. 2007b. *Sonochemistry and the environment – Providing a “green” link between chemistry, physics and engineering*. *Ultrasonics sonochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 1350-4177. 14:4 476-483;

MASON, T. J., ed. lit. 1996. *Advances in Sonochemistry*. 1 ed. London: Elsevier Science, 4 vol. ISBN 978-1-559-38793-4. p. 184;

MASON, T. J.; LORIMER, P. J. 2002. *Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-30205-5. p. 3-17;

MASON, T. J.; PÉTRIER, C. 2004. *Ultrasound processes*. In PARSONS, S., ed. lit. *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*. 1 ed. London: IWA. ISBN 978-1-843-39017-6. p. 185-206;

MEAD, E. L.; SUTHERLAND, R. G.; VERRALL, R. E. 1976. *The effect of ultrasound on water in the presence of dissolved gases*. *Canadian Journal of Chemistry*. Canada: NRC Canada. ISSN 1480-3291. 54:7 1114-1118;

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. 1999. *Cyanobacteria in the environment*. In CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Great Britain: St Edmundsbury Press. ISBN 978-0-419-23930-7. p. 25-48;

OWUOR, K.; OKONKWO, J.; GINKEL, C.; SCOTT, W. 2007. *Environmental factors affecting the persistence of toxic phytoplankton in the Hartbeespoort Dam*. *Water Research Commission*. ISBN: 978-1-770-05623-7. p. 1-15;

PAERL, H. W.; USTACH, J. F. 1982. *Blue-green algal scums: An explanation for their occurrence during freshwater blooms. Limnol. Oceanogr.* ISSN 0024-35-90. 27:2 212-217;

PEARL, H. 2008. *Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater – marine continuum. Advances in experimental medicine and biology.* New York: Plenum. ISSN 0065-2598. 619 vol. 217-228;

PREMAZZI, G.; VOLTERRA, L. 1993. *Microphyte Toxins: a manual for toxic detection, environmental monitoring and therapies to conteract intoxications.* Luxemburg: JRC CEC. ISSN 1028-5593. p. 129-153;

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. 1998. *Microbiology.* Fourth ed. McGraw-Hill. ISBN 978-0-071-15830-5. p. 443-867;

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STAINER, R. 1979. *Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology.* Great Britain. 111 vol. 1-61;

ROMERO, L. V. 2007. *Ultra-sons e tratamento de lamas. Indústria e Ambiente.* Porto: Publindustria. ISSN 1645-1783. 165 277/01, Nº45 22-25;

SANTOS, H.M.; CAPELO, J.L. 2007. *Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. Talanta.* Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0039-9140. 73:5 795-802;

SIMMONDS, E. J., ed. lit.; MACLENNAN, D. N. 2005 - *Fisheries acoustics: theory and practice.* 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-632-05994-2. p. 127-139;

SIVONEN, K.; JONES, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* Great Britain: St Edmundsbury Press. ISBN 978-0-419-23930-7. p. 55-102;

SMITH V. H.; TILMAN G. D.; NEKOLA J. C. 1999. *Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental pollution*. Oxford: Elsevier Science. ISSN 0269-7491. 100:1-3 p. 179-196;

SONG, W.; CRUZ, A. A. de la; REIN, K.; O'SHEA, K. E. 2006. *Ultrasonically Induced Degradation of Microcystin-LR and -RR: Identification of Products, Effect of pH, Formation and Destruction of Peroxides. Environmental science & technology*. Washington: American Chemical Society. ISSN 0013-936X. 40:12 3941-3946;

TANG, J. W.; WU, Q. Y.; HAO, H. W.; CHEN, Y.; WU, M. 2004. *Effect of 1.7 MHz ultrasound on a gas-vacuolate cyanobacterium and a gas-vacuole negative cyanobacterium. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 0927-7765. 36:2 115-121;

TANG, W. Z. 2004. *Physicochemical treatment of hazardous wastes*. 1 ed. Florida: CRC Press. ISBN 978-1-566-76927-3. p. 423-431;

Ultrasonic algae control – A non-chemical approach to eliminating algae using ultrasound waves. Canada: CanadianPond.ca Products Ltd, 1999-2007. [Consult. 1 Ag. 2009]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.canadianpond.ca/sonic.html>>;

VASCONCELOS, V. 2006. *Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. The ecology of the Iberian inland waters: Homage to Ramón Margalef*. Madrid: Limnetica. ISSN 0213-8409. 25:1-2 425-432;

VISSER, P. M.; IBELINGS, B. W.; MUR, L. R.; WALSBY, A. E. 2005. *The ecophysiology of the harmful cyanobacterium microcystis: Features explaining its success and measures for its control*. In Huisman, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M. *Aquatic Ecology*. Netherland: Springer. ISBN 978-1-402-03009-3. 3 vol. p. 109-142;

WALSBY, A. E. 1975. *Gas Vesicles. Microbiological reviews*. Washington: American Society for Microbiology. 26:1 427-439;

WALSBY, A. E. 1994. *Gas Vesicles. Microbiological reviews*. Washington: American Society for Microbiology. ISSN 0146-0749. 58:1 94-144;

WETZEL, R. G. 1993. *Limnology*. 2.nd ed. Universidade de Michigan: Saunders. ISBN 978-0-721-69240-1. p. 166-431;

WHITTON, B. A., ed. lit.; POTTS, M., ed. lit. 2000. *The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. ISBN 978-0-792-34755-2. p 176-184.

WIEGAND C.; PFLUGMACHER S. 2005. *Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and applied pharmacology*. San Diego: Elsevier Science. ISSN 0041-008X. 203:3 201-218;

WOLK, P. C. 1973. *Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae. Bacteriological reviews*. American Society for Microbiology. 37:1 32-101;

YANG, Z.; KONG, F.; SHI, X.; CAO, H. 2006. *Morphological response of Microcystis aeruginosa to grazing by different sorts of zooplankton. Hydrobiologia*. Dordrecht: Springer. ISSN 0018-8158. 563:1 225-230;

ZHANG, G.; ZHANG, P.; LIU, H.; WANG, B. 2006a. *Ultrasonic damages on cyanobacterial photosynthesis. Ultrasonics sonochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 1350-4177. 13:6 501-505;

ZHANG, G.; ZHANG, P.; WANG, B.; LIU, H. 2006b. *Ultrasonic frequency effects on the removal of Microcystis aeruginosa. Ultrasonics sonochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science. ISSN 1350-4177. 13:5 446-450.

ANEXO I

Composição do Meio BG 11

Quadro I.1 – Composição do meio BG 11 (Rippka *et al.*, 1979).

Componente	Concentração da solução (g/L)	Volume (mL/L)
NaNO ₃	150	10
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1
Ácido cítrico combinado com ácido férico de amónio	6	1
EDTA	1	1
Na ₂ CO ₃	20	1
Trace Metal Solution	Quadro I.2	1
NH ₄ Cl	1,1	1

Quadro I.2 – Composição da solução de metais em concentrações vestigiais.

Componente	Concentração da solução (g/L)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
NaMoO ₄ .5H ₂ O	0,390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494

As substâncias apresentadas no Quadro II devem ser dissolvidas em separado.

O pH inicial do meio é de aproximadamente 8,5, devendo ser corrigido para 7,5 para se proceder à autoclavagem.

ANEXO II

Concentrações médias de microcistinas intracelulares e extracelulares e de sólidos suspensos totais (SST)

Quadro II.1 – Concentrações médias de microcistinas intracelulares por ensaio, expressas em µg MC-LR equiv./L.

AMOSTRA	ENSAIO 1 (35 KHz, 20%)	ENSAIO 2 (35 KHz, 50%)	ENSAIO 3 (35 KHz, 100%)	ENSAIO 4 (130 KHz, 20%)	ENSAIO 5 (130 KHz, 50%)	ENSAIO 6 (130 KHz, 100%)
US - 0	57,2	9,3	1,5	1,4	47,7	36,1
US - A	56,4	6,9	0,8	0,6	44,7	42,9

Quadro II.2 – Concentrações médias de microcistinas extracelulares por ensaio, expressas em µg MC-LR equiv./L.

AMOSTRA	ENSAIO 1 (35 KHz, 20%)	ENSAIO 2 (35 KHz, 50%)	ENSAIO 3 (35 KHz, 100%)	ENSAIO 4 (130 KHz, 20%)	ENSAIO 5 (130 KHz, 50%)	ENSAIO 6 (130 KHz, 100%)
US - 0	0,6	6,9	2,2	0,43	1,0	3,3
US - A	0,8	8,5	2,6	1,3	1,9	3,9

Quadro II.3 – Concentrações de sólidos suspensos totais (SST) de cada ensaio, expressas em mg/L.

AMOSTRA	ENSAIO 1 (35 KHz, 20%)	ENSAIO 2 (35 KHz, 50%)	ENSAIO 3 (35 KHz, 100%)	ENSAIO 4 (130 KHz, 20%)	ENSAIO 5 (130 KHz, 50%)	ENSAIO 6 (130 KHz, 100%)
US - 0	52	35	28	32	28	50
US - A	56	37	30	33	35	62