

Protocolo experimental

Aquacultura multitrófica integrada

Enquadramento Teórico

A aquacultura animal intensiva liberta elevadas quantidades de nutrientes no ecossistema aquático, consequência do facto de que apenas 30% da alimentação fornecida é retida pelas espécies cultivadas e mais de 70% é libertada no meio ambiente, podendo conduzir à eutrofização das águas costeiras. Os sistemas de aquacultura multitrófica integrada (IMTA) utilizam espécies de diferentes níveis tróficos de forma a reduzir os desperdícios enquanto a produtividade total aumenta. IMTA é a prática que combina, nas proporções adequadas, o cultivo de espécies de peixe ou camarão com a cultura de espécies que extraem a matéria orgânica (i.e., que se alimentam das partículas orgânicas, como fezes e restos de alimento) e espécies que extraem a parte inorgânica (i.e., que utilizam os nutrientes inorgânicos dissolvidos na água). Mexilhões, ostras, amêijoas, ouriços-do-mar ou poliquetas são alguns dos organismos mais utilizados para remover a matéria orgânica particulada. Macroalgas (ex. *Ulva*, *Gracilaria*, *Saccharina*, *Laminaria*) são os organismos tipicamente usados para filtrar os nutrientes inorgânicos. Assim, quando integrados com a aquacultura de peixes ou camarão, os organismos extrativos transformam desperdícios em recursos produtivos. Deste modo, os nutrientes desperdiçados na aquacultura animal intensiva são considerados um recurso e não um encargo ou poluição. O IMTA permite criar sistemas equilibrados de sustentabilidade ambiental (biomitigação), de estabilidade económica (diversificação de produtos e redução de risco) e aceitabilidade social (melhores práticas de gestão).

Objetivos

Esta atividade permitirá aos alunos construir uma pequena instalação de aquacultura multitrófica integrada, promovendo a compreensão de aspetos essenciais da biodiversidade, dos problemas de eutrofização associados à descarga de efluentes enriquecidos em nutrientes inorgânicos, e de soluções para a exploração sustentada de recursos marinhos, com minimização do impacto no

ambiente e valorização económica através da diversificação de produtos. Este protocolo enquadra-se na Área Curricular das Ciências Naturais do 3º Ciclo do Ensino Básico e Áreas Curriculares de Biologia e Geologia (11º ano) e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Insere-se no Princípio Essencial 5 “O Oceano suporta uma imensa diversidade de vida e de ecossistemas” e no Princípio Essencial 6 “O Oceano e a humanidade estão fortemente interligados” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano¹.

¹ <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>

www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/OCEANLAB.php

Material abrangido por licença Creative Commons



Material

- 4 Aquários de 5L
- Bomba de ar
- Bomba de água
- Exemplares de peixe de água salgada
- Exemplares de espécies que extraem a matéria orgânica (ex. Mexilhões, ostras, amêijoas, ouriços-do-mar, poliquetas, etc.)
- Exemplares de espécies que extraem a parte inorgânica (Macroalgas (ex. *Ulva*, *Gracilaria*, *Saccharina*, *Laminaria*))
- Tubos
- Torneiras
- Água Salgada
- Sonda Multiparamétrica para medição de temperatura e oxigênio dissolvido
- Kits de medição de parâmetros químicos (pH, íão amónia (NH_4^+), íão nitrato (NO_3^-) e íão fosfato (PO_4^{3-}))

Procedimento

A. Montagem do sistema de aquacultura multitrófica integrada (IMTA)

1. Comece por montar o sistema de aquacultura multitrófica integrada, colocando os 3 aquários que irão conter os animais e as algas, com um ligeiro desnível entre cada aquário. Assim, o primeiro aquário deve ficar mais elevado que o segundo aquário e o segundo aquário deve ficar mais elevado que o terceiro aquário, de modo a permitir que a água circule entre os aquários somente com o auxílio da gravidade.
2. Colocar o quarto aquário ao mesmo nível que o terceiro e ligar os dois através de um tubo. Este aquário irá servir como aquário de armazenamento da água do sistema.
3. Colocar uma bomba de água no aquário de armazenamento e fazer a ligação da bomba de água ao primeiro aquário, de modo a permitir a recirculação da água. Colocar uma torneira na mangueira que faz a ligação de maneira a ajustar o fluxo de água que circula no sistema.
4. Encher os aquários com água salgada e ligar a bomba de água para iniciar a circulação de água.

5. Utilizando a bomba de ar, iniciar o arejamento nos primeiro, segundo e terceiro aquários.
6. Colocar os peixes no primeiro aquário, perfazendo uma densidade de biomassa de 10 kg/m^3 .
7. Colocar os exemplares de espécies que extraem a matéria orgânica no segundo aquário, perfazendo uma densidade de biomassa de 25 kg/m^3 .
8. Colocar os exemplares de macroalgas no terceiro aquário, perfazendo uma densidade de biomassa de 10 kg/m^3 .

B. Medição dos parâmetros físico-químicos e biológicos no sistema IMTA

1. Desligar a bomba de água de modo a parar o fluxo de água entre os diferentes aquários.
2. Com o auxílio da sonda multiparamétrica, medir os valores de temperatura e oxigénio dissolvido no início (1º aquário - onde se encontram os peixes) e no final do sistema (3º aquário - onde se encontram as algas) IMTA.
3. Considera a 1ª medição como o tempo zero. Repetir as medições de 30 em 30 minutos. Registrar os valores obtidos.
4. Com o auxílio dos diversos Kits de medição de parâmetros de químicos, e seguindo as instruções dos diferentes Kits, medir os valores de pH, ião amónia (NH_4^+), ião nitrato (NO_3^-) e ião fosfato (PO_4^{3-}) no início (1º aquário - onde se encontram os peixes) e no final do sistema (3º aquário - onde se encontram as algas) IMTA.
5. Considera a 1ª medição como o tempo zero. Repetir as medições de 30 em 30 minutos. Registrar os valores obtidos.

3. Indica qual a espécie que utilizaste no teu sistema de aquacultura multitrófica integrada para extrair a matéria orgânica e qual a espécie que utilizaste para extrair a matéria inorgânica.

4. Regista na tabela os valores de temperatura, oxigénio dissolvido, pH, ião amónia (NH_4^+), ião nitrato (NO_3^-) e ião fosfato (PO_4^{3-}) que mediste ao longo do tempo, registando o respetivo tempo em minutos. Elabora a legenda da tabela.

Tabela 1:

Tempo (minutos)	Temperatura		Oxigénio dissolvido		pH		Ião amónia (NH_4^+)		Ião nitrato (NO_3^-)		Ião fosfato (PO_4^{3-})	
	1° Aquário	3° Aquário	1° Aquário	3° Aquário	1° Aquário	3° Aquário	1° Aquário	3° Aquário	1° Aquário	3° Aquário	1° Aquário	3° Aquário

5. Representa através de gráficos, nos sistemas de eixos apresentados, a variação da temperatura, do oxigénio dissolvido, do pH, ião amónia (NH_4^+), ião nitrato (NO_3^-) e ião fosfato (PO_4^{3-}) ao longo do tempo e para o início e final do IMTA. Legendas os eixos do X e do Y e a figuras que elaboraste.

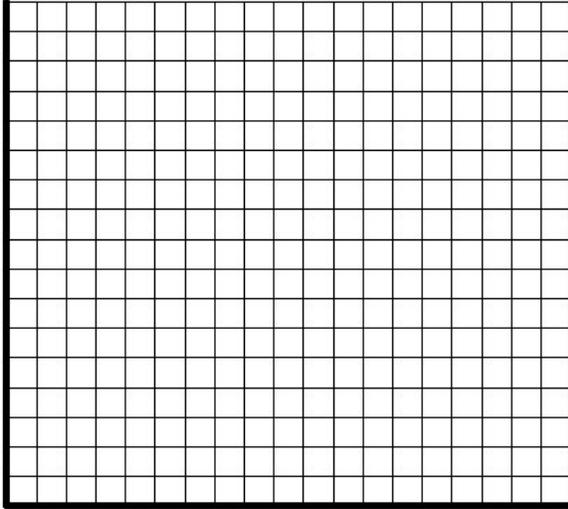


Figura 1.

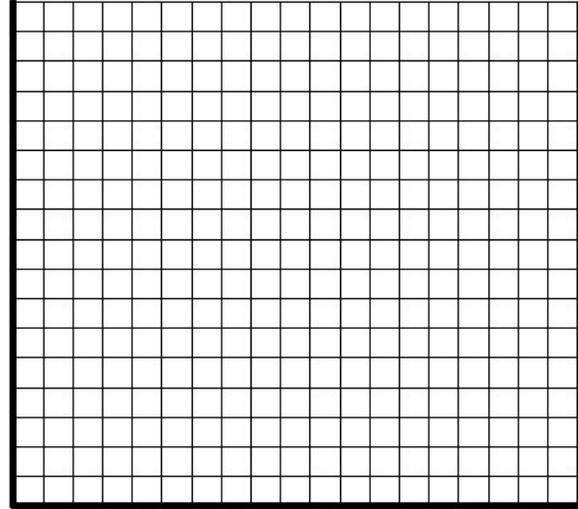


Figura 2.

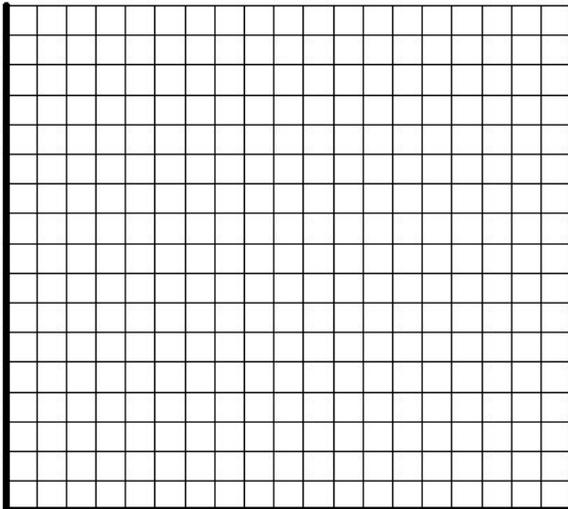


Figura 3.

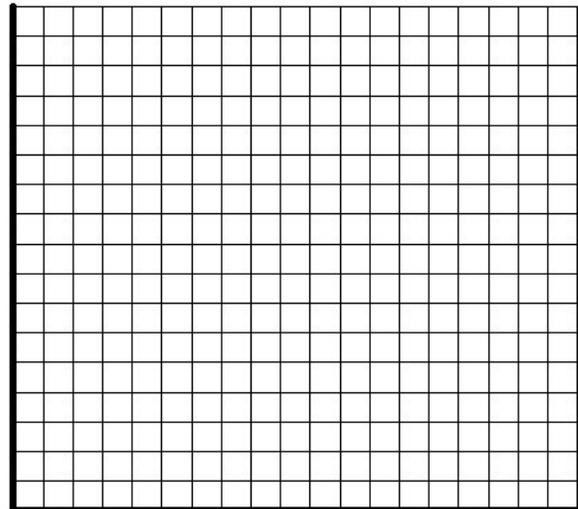


Figura 4.

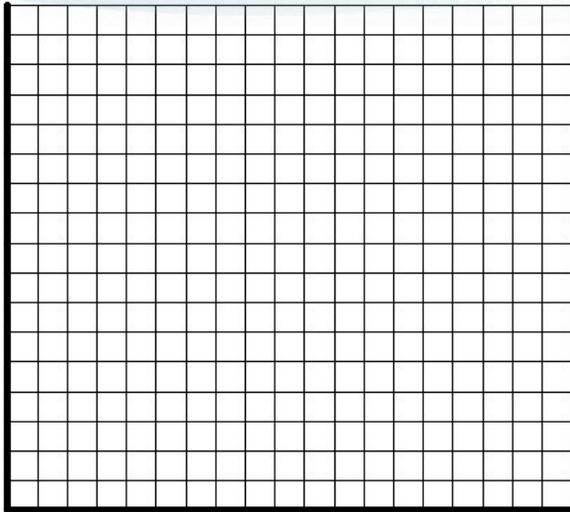


Figura 5.

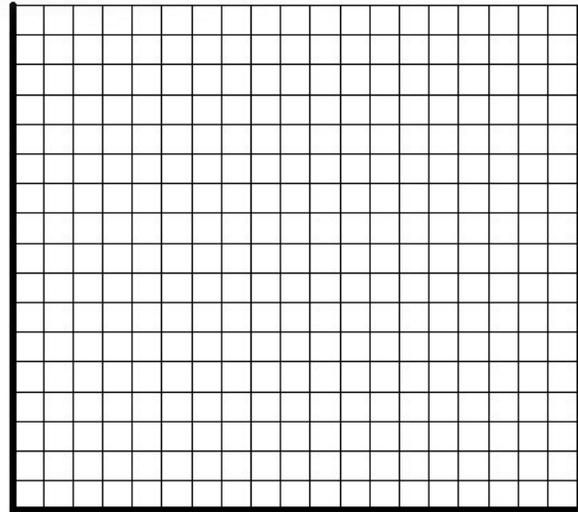


Figura 6.

6. Justifica os resultados que obtiveste em relação à variação da concentração de nutrientes (ião amónia (NH_4^+), ião nitrato (NO_3^-) e ião fosfato (PO_4^{3-})) ao longo do tempo e no início e final do sistema IMTA.

7. Indica as vantagens do IMTA em relação à aquacultura convencional.

Guarda os teus resultados e escreve um mini artigo sobre a aquacultura multitrófica integrada para o nosso blog de ciências (<https://ciimarnaescola.wordpress.com/>).

Há um prémio para o melhor mini artigo. Sabe mais e explora os sítios da Literacia do Oceano e Kit do mar em <http://www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/oceanlab.php>

Protocolo experimental

Biorremediação: biodegradação de contaminantes orgânicos por microrganismos

Enquadramento Teórico

Os derrames do petróleo, e de outros compostos que são transportados por via marítima em grandes quantidades, são um risco que ameaça sistematicamente os oceanos e as suas zonas costeiras em todo o mundo. As marés negras causadas por estes acidentes constituem verdadeiras catástrofes ecológicas, com efeitos devastadores e persistentes, difíceis de mitigar. Torna-se pois necessário empregar estratégias de limpeza eficientes para o combate deste enorme problema ambiental.

Os microrganismos desempenham um papel fundamental nos oceanos, sendo responsáveis, entre outros, por manter os principais ciclos biogeoquímicos e degradar diversos poluentes orgânicos. A biorremediação é o processo pelo qual os organismos vivos tais como, bactérias, fungos, ou as suas enzimas são utilizados para reduzir ou remover poluentes ambientais. Isso acontece porque muitos microrganismos têm uma capacidade natural para degradar contaminantes orgânicos, podendo estes ser utilizados como fonte de carbono e energia. A biorremediação constitui um meio de remoção de poluentes ambientais de uma forma eficiente, económica e amiga do ambiente, podendo ser aplicada para a descontaminação de águas, solos e ar. Ao nível dos oceanos a biorremediação tem, por exemplo, um papel preponderante na descontaminação de derrames de petróleo, auxiliando na recuperação dos ecossistemas marinhos. Esta técnica pode também ser utilizada na bioremediação de produtos de higiene e de cuidados pessoais que poluem muitas vezes os ecossistemas aquáticos.

Objetivos

Este protocolo tem como objetivo investigar o potencial de biodegradação, por microrganismos com origem ambiental, de compostos poluentes orgânicos, usando como modelo detergentes e produtos de cuidados pessoais. Nesta experiência os jovens poderão compreender a importância dos

microrganismos para a regeneração de ambientes marinhos poluídos com contaminantes orgânicos. Pretende-se que os jovens possam avaliar e reconhecer o potencial de microrganismos para degradar poluentes orgânicos, identificando estripes microbianas que possam ser eficientes na remoção destes poluentes. Espera-se assim sensibilizar os jovens para o flagelo da poluição dos oceanos e sistemas aquáticos, as suas consequências e soluções naturais e eficientes de tratamento. Este protocolo enquadra-se na Área Curricular de Biologia e Geologia (11º ano) e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Insere-se no Princípio Essencial 5 “O Oceano suporta uma imensa diversidade de vida e de ecossistemas”, no Princípio Essencial 6 “O Oceano e a humanidade estão fortemente interligados” e no Princípio Essencial 7 “Há muito por descobrir e explorar no Oceano” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano¹.

¹ <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>

www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/OCEANLAB.php

Material abrangido por licença Creative Commons



Material

- Placas de Petri
- Meio de Cultura (Bushnell Haas contendo 15g/L de agar)
- Frascos
- Pipeta automática 1ml
- Pontas de 1 ml
- Areia/Terra
- Solução salina (NaCl a 0,85%)
- Eppendorfs
- Soluções contaminantes (ex: protetor solar, detergente lava-tudo, detergente da loiça normal, detergente ecológico, champô)
- Espalhadores/cotonetes

Procedimento

A. Preparação de placas de Petri contendo o meio de cultura sólido

1. Pesar 3,27 g de meio Bushnell Haas Broth e 15 g de agar e dissolver em 1 L de água destilada.
2. Agitar em placa de agitação até dissolver completamente (ferver).
3. Dividir o meio por diferentes frascos de acordo com o nº de soluções contaminantes que se pretende testar.
4. Autoclavar os diferentes frascos a 121 °C durante 15 minutos.
5. Deixar arrefecer até à temperatura de $\pm 45^{\circ}\text{C}$ e juntar a cada frasco os detergentes a 0,1%.
6. Agitar ligeiramente e verter o meio para placas de Petri.

B. Inoculação

1. Recolher de um local pretendido uma amostra de areia ou terra.
2. Num frasco, adicionar uma colher de areia ou terra a 50 ml de solução salina e agitar vigorosamente.
3. Repousar o frasco de modo a permitir a decantação da areia ou terra.

4. Diluir o sobrenadante, retirando para um eppendorf 0,1 ml de sobrenadante e adicionando 0,9 ml de solução salina (diluição de 10x).
5. Repetir este passo mais uma vez, mas desta vez retirar 0,1 ml de amostra da diluição 10X e adicionar mais 0,9 ml de solução salina (diluição 100x).
6. Plaquear a amostra não diluída e as diluições de 10x e 100 x nos meios sólidos preparados anteriormente, espalhando 0,1ml de amostra.
7. Identificar cada placa atribuindo-lhe um número e identificando igualmente as condições presentes na placa (solução contaminante e diluição utilizada).
8. Incubar à temperatura de 25 °C durante 48-72 horas.

C. Análise dos Resultados

1. Após um período de 48-72 h, verificar o crescimento nas placas e registar o nº de colónias na diluição que apresente uma contagem entre 30 e 300 colónias.
2. Para cada detergente calcular o nº de unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de amostra, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colónias} \times 1/\text{diluição}}{\text{Volume plaqueado (0,1 ml)}}$$

3. Concluir acerca da capacidade dos microrganismos provenientes de amostra de areia/terra para biodegradar os detergentes testados e comparar as biodegradabilidades dos diferentes contaminantes.

Biorremediação: biodegradação de de contaminantes orgânicos por microrganismos

Registo da experiência

1. Indica quais os objetivos desta atividade experimental.
2. Regista na tabela 1 a solução contaminante e a diluição utilizada, o nº de colónias e o respetivo valor das unidades formadoras de colónias (UFC) por ml para as diferentes placas. Elabora a legenda da tabela.

Tabela 1:

	Solução Contaminante	Diluição	Nº de Colónias	UFC/ml
Placa 1				
Placa 2				
Placa 3				
Placa 4				
Placa 5				
Placa 6				
Placa 7				
Placa 8				
Placa 9				
Placa 10				
Placa 11				
Placa 12				

Protocolo experimental

Biotecnologia Azul: controlar a adesão de organismos incrustantes usando derivados naturais

Enquadramento Teórico

A incrustação de organismos em superfícies submersas de navios e infraestruturas portuárias e navais representa um dos maiores problemas que as indústrias marítimas enfrentam. Por exemplo, estima-se que custe certa de um bilião de dólares por ano só à marinha Norte Americana. A maior parte das tintas anti-incrustantes usadas habitualmente contêm biocidas (ex.: tributilestanho, metais, antibióticos) tóxicos para os organismos marinhos. A necessidade de encontrar alternativas não tóxicas, amigas do ambiente, é por isso premente. No meio marinho há uma enorme diversidade de organismos que se adaptaram a diferentes ambientes pela produção de substâncias metabólicas específicas que lhes permitem tirar vantagem das condições particulares a que estão sujeitos. Muitos destes compostos têm sido investigados com o objetivo de encontrar bioatividade de interesse para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou industriais com valor económico (biotecnologia azul). Uma das potencialidades destes produtos derivados naturais é a sua potencial ação anti-incrustante, usada no controlo da incrustação de determinados organismos a superfícies submersas (navios, infraestruturas portuárias e da industria naval).

Objetivos

Nesta experiência os jovens realizarão ensaios com o intuito de determinar a capacidade de inibição de produção da estrutura adesiva (bisso) do mexilhão por extratos de cianobactérias. A experiência permitirá também sensibilizar os jovens para a biodiversidade marinha, para as potencialidades da biotecnologia azul e para a gestão sustentável dos recursos marinhos valorizando a sua importância ecológica e económica. Este protocolo enquadra-se na Área Curricular de Biologia e Geologia (11º ano) e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Insere-se no Princípio Essencial 5 “O Oceano suporta uma imensa diversidade de vida e de ecossistemas” e no Princípio Essencial 7 “Há muito por

descobrir e explorar no Oceano” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano¹.

¹ <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>

www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/OCEANLAB.php

Material abrangido por licença Creative Commons



Material

- Mexilhões (até 1 cm de comprimento de concha)
- Produto natural bioativo (extrato de organismo marinho)
- Sulfato de cobre (controlo positivo)
- Água do mar filtrada ou água salgada artificial
- Caixas de Petri (9)
- Tesoura
- Pinça
- Tabuleiro
- Papel de alumínio
- Caneta de acetato

Procedimento

1. Limpar cuidadosamente os mexilhões com a tesoura de forma a retirar todos os vestígios anteriores de bisco.
2. Colocar os mexilhões num tabuleiro mergulhados em água do mar durante 10-15 minutos.
3. Selecionar os mexilhões que apresentem o comportamento de ‘pesquisa de substrato’ caracterizado pela hiperextensão do pé para o exterior da concha (ver exemplo na figura 1A).

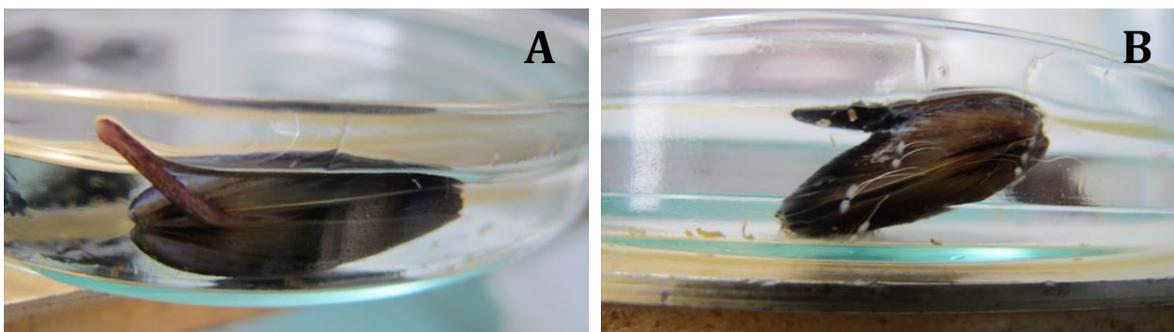


Figura 1: Mexilhão exibindo o comportamento de pesquisa de substrato (A) e fixo ao substrato por meio de fiadas de bisco (B).

4. Distribuir os mexilhões selecionados pelas caixas de Petri, 3 caixas por tratamento e 3 indivíduos por caixa, que funcionarão como réplicas de cada tratamento.
5. Colocar 60 ml de água do mar filtrada em 3 das caixas de Petri, 60 ml da solução enriquecida com o produto natural bioativo noutras três caixas, e ainda 60 ml da solução de sulfato de cobre ($5\mu\text{M}$) num terceiro conjunto de caixas (Figura 2).
6. Identificar devidamente com rótulo as caixas de Petri e envolvê-las com papel de alumínio para maximizar a produção do bisso.
7. Colocá-las num local com temperatura controlada entre 15 e 20°C durante entre 12 a 15 horas.
8. Observar cada mexilhão individualmente e com o auxílio da pinça registar se se verificou adesão ao substrato (caixa de Petri) pela produção de bisso (ver figura 1B), e em caso afirmativo registar o número de fiadas produzidas.

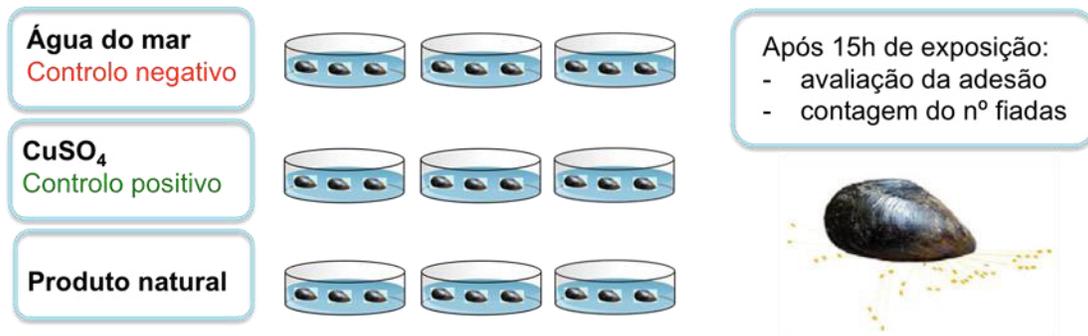


Figura 2: Esquema do desenho experimental.

Biotecnologia Azul: controlar a adesão de organismos incrustantes usando derivados naturais

Registo da experiência

1. Regista na tabela a presença de adesão ou não adesão dos mexilhões à placa de Petri e o número de fiadas de bisso de cada mexilhão, para as diferentes réplicas de cada tratamento. Elabora a legenda da tabela.

Tabela 1:

	Réplicas	Adesão (S/N)			Nº de fiadas de bisso					
		1	2	3	1	2	3			
Água salgada	Mexilhão 1									
	Mexilhão 2									
	Mexilhão 3									
	Média							Médias totais		
CuSO4	Mexilhão 1									
	Mexilhão 2									
	Mexilhão 3									
	Média							Médias totais		
Produto natural	Mexilhão 1									
	Mexilhão 2									
	Mexilhão 3									
	Média							Médias totais		

Protocolo experimental

Como ocorre a acidificação dos oceanos?

Enquadramento Teórico

Os oceanos absorvem anualmente cerca de 25% do dióxido de carbono (CO_2), proveniente de atividades humanas, que é libertado para a atmosfera. Desta forma atenuam fortemente o impacto no clima deste gás com efeito de estufa. Contudo, a dissolução do CO_2 na água origina a formação de ácido carbónico que acidifica a água. As emissões de CO_2 para a atmosfera têm sofrido um aumento considerável desde a Revolução Industrial, e em particular nas últimas décadas. Em consequência, é notório o aumento da acidificação dos oceanos. Este incremento de acidez tem consequências nos organismos marinhos. Diminui significativamente a taxa de calcificação de organismos com conchas, carapaças e esqueletos de calcário, como por exemplo microalgas, moluscos, crustáceos, e corais. Pode também alterar a fisiologia e reprodução de alguns organismos. Estas alterações têm repercussões tanto ecológicas, afetando as cadeias tróficas e a biodiversidade, como económicas causando sérios prejuízos no sector das pescas.

Objetivos

Esta atividade introduz a noção de efeito de estufa, demonstrando experimentalmente a acidificação dos oceanos causada pelo aumento do dióxido de carbono atmosférico. Para compreender os efeitos adversos desta acidificação nas comunidades marinhas, propõe-se a verificação da erosão do carbonato de cálcio presente no exosqueleto de animais marinhos e conchas, através da reação deste com uma solução aquosa ácida. Este protocolo enquadra-se na Área Curricular das Ciências Naturais do 2º e 3º Ciclo do Ensino Básico e no Princípio Essencial 3 “O Oceano exerce uma influência importante no clima” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano¹.

¹ <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>

Material

- Solução colorimétrica de pH (por exemplo, extrato de couve roxa)
- Escala colorimétrica de pH
- Bicarbonato de sódio
- Ácido acético
- Água destilada
- Conchas de animais marinhos
- 2 Frascos Schott, um de 250 mL e outro de 500 mL
- Tubo flexível
- Palhinha
- Parafilm
- Gobelés
- Provetas
- Colher

Procedimento

A. Acidificação da água induzida pela dissolução de CO₂

Experiência 1

1. Passar o tubo flexível pelos orifícios feitos nas tampas dos frascos Schott, unindo assim os dois frascos. Usar Parafilm para selar os orifícios (os frascos devem ficar bem vedados permitindo apenas trocas gasosas através do tubo) (figura 1).
2. Colocar no frasco de 250 mL, 30 mL de extrato de couve roxa e 60 mL de água destilada. Comparar a cor da solução com a escala colorimétrica de pH e anotar o valor de pH.
3. Colocar no frasco de 500 mL, 100 mL de ácido acético e uma colher de chá de bicarbonato de sódio (solução C). O ácido acético reage quimicamente com o bicarbonato de sódio libertando CO₂ (de acordo com a reação $\text{CH}_3\text{COOH} (\text{l}) + \text{NaHCO}_3 (\text{aq}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COONa} (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l}) + \text{CO}_2 (\text{g})$). O CO₂ vai difundir-se através do tubo para o frasco com a solução de água e indicador baixando o seu pH.

4. Observar as alterações de cor que ocorrem na solução de água e indicador de pH (se necessário agitar o frasco). Comparar as cores obtidas com a escala colorimétrica de pH. Anotar as alterações observadas e o valor de pH na folha de registo da experiência.

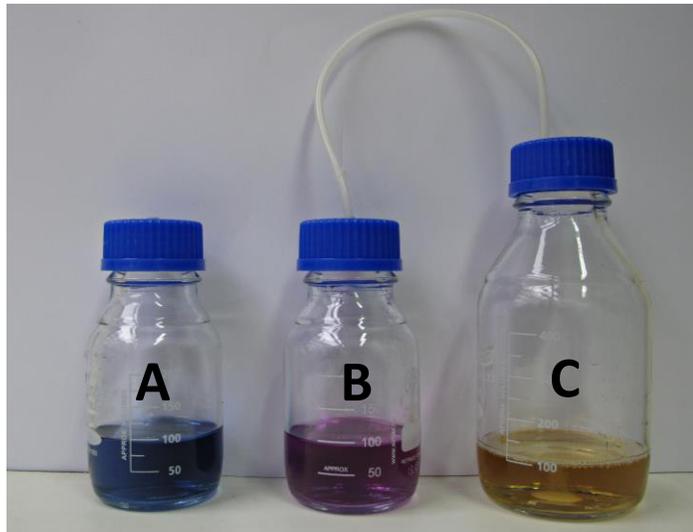


Figura 1: Exemplificação da experiência. Frasco A – solução de extracto de couve roxa (controlo); Frasco B – solução de extracto de couve roxa após dissolução de Co_2 libertado no frasco C; Frasco C – solução de ácido acético.

Experiência 2

1. Colocar volumes iguais de solução de extrato de couve roxa (15 mL de extrato de couve roxa + 30 mL de água destilada) em dois gobelés. Um dos gobelés servirá de controlo e o outro de recipiente teste.
2. Soprar no líquido do recipiente teste, com o auxílio de uma palhinha, fazendo borbulhar a solução. Comparar as alterações de cor observadas com a solução controlo. Registar as alterações observadas e, comparando com a escala colorimétrica de pH, anotar o valor de pH determinado.

B. Efeito da acidificação dos oceanos em conchas de animais marinhos

1. Colocar num gobelé 15 mL de extrato de couve roxa e 30 mL de ácido acético. Nota: a solução deve ficar bem vermelha ($\text{pH} < 3$).
2. Colocar noutro gobelé 15 mL de extrato de couve roxa e 30 mL de água destilada.
3. Colocar uma concha em cada gobelé e observar a libertação de CO_2 .

Como ocorre a acidificação dos oceanos?

Registo da experiência

1. Formula e indica as hipóteses a testar nestas experiências.
2. Indica que alterações observaste nas experiências de acidificação da água pelo CO₂. Qual o pH que obtiveste na experiência 1 e na experiência 2?
3. Qual a origem do CO₂ que causou acidificação da água na experiência 2.
4. Em que gobelé observaste maior libertação de CO₂ na experiência de estudo dos efeitos da acidificação nas estruturas calcárias de animais marinhos?
5. Indica três acções que podes desenvolver no teu dia-a-dia para ajudar a diminuir a intensa libertação humana de dióxido de carbono para a atmosfera, contribuindo para minimizar a acidificação dos oceanos.

Guarda os teus resultados e escreve um mini artigo sobre a acidificação para o nosso blog de ciências (<https://ciimarnaescola.wordpress.com/>).

Há um prémio para o melhor mini artigo. Sabe mais e explora os sítios da Literacia do Oceano e Kit do mar em <http://www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/oceanlab.php>

Protocolo experimental

Monitorização ambiental e impacto da poluição

Enquadramento Teórico

Os ecossistemas aquáticos, nomeadamente os estuarinos e costeiros, têm recebido ao longo de décadas os resíduos resultantes do desenvolvimento das atividades humanas, através por exemplo da lixiviação de fertilizantes e escorrência de águas de rega de campos agrícolas, da libertação para o ambiente de águas residuais de atividades domésticas e industriais, da libertação acidental proveniente de atividades de produção e transporte de combustíveis. Estas atividades têm resultado na contaminação dos ecossistemas aquáticos por poluentes de vários grupos, nomeadamente pesticidas, hidrocarbonetos, metais e fármacos. Muitas destas substâncias químicas são muito tóxicas para os organismos, podendo provocar atrasos de crescimento e desenvolvimento, diminuir a reprodução ou provocar a sua morte, diminuindo a saúde dos ecossistemas.

A Toxicologia Ambiental é uma área multidisciplinar, que procura compreender os mecanismos de toxicidade dos contaminantes. Assim, desenvolvem-se ferramentas para avaliar os efeitos de várias classes de contaminantes ambientais em diferentes organismos. Um biomarcador é geralmente definido como uma resposta biológica a agentes químicos ambientais que fornecem uma medida de exposição e/ou de efeito tóxico. Alguns dos biomarcadores mais utilizados são as atividades de enzimas (proteínas dos organismos que intervêm em reações químicas vitais para o seu bom funcionamento e equilíbrio fisiológicos) relacionadas com a transmissão colinérgica de impulsos nervosos entre neurónios e células musculares (neuromuscular) ou com reações de destoxificação e defesa antioxidativa. É disso exemplo a atividade da enzima acetilcolinesterase (transmissão neuromuscular), frequentemente usada tanto em monitorização ambiental como em ensaios laboratoriais de exposição a contaminantes. Por exemplo, no caranguejo verde a actividade desta enzima no tecido muscular está ligada à locomoção, um comportamento essencial para que este animal consiga obter o seu alimento, escapar às suas presas e reproduzir-se.

Objetivos

Nesta experiência os jovens avaliarão os níveis de um biomarcador de efeitos neurotóxicos (atividade da enzima acetilcolinesterase) em diferentes tecidos de um organismo marinho (o caranguejo, *Carcinus maenas*). A experiência sensibilizará para o impacto da poluição no Oceano, os efeitos da interação entre contaminantes e propriedades físico-químicas da água nos organismos, assim como para a necessidade de gestão integrada do ambiente marinho. Este protocolo enquadra-se na Área Curricular de Biologia e Geologia (11º ano) e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Insere-se no Princípio Essencial 5 “O Oceano suporta uma imensa diversidade de vida e de ecossistemas” e no Princípio Essencial 6 “O Oceano e a humanidade estão fortemente interligados” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano¹.

¹ <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>

Material

- Amostra a avaliar (produzida por homogeneização e centrifugação do tecido a analisar)
- Espectrofotómetro (leitor de microplacas)
- Tubos de 15 ml
- Microplacas de 96 poços
- Micropipetas
- Solução tampão fostato 0,1 M, pH = 7,2 (Manter a -4°C)
- Solução de acetilcolina 0,075 M (Proteger da luz; manter a -4°C)
- Solução de DTNB (Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) 10mM (Proteger da luz; manter a -4°C)
- Solução de reação
(Adicionar 30 ml do tampão fostato a 0,2 ml de solução de acetilcolina e 1 ml de solução de DTNB. Proteger da luz; preparado na hora)

Procedimento

A. Amostras a avaliar

Amostras de tecidos foram previamente recolhidas, congeladas e posteriormente processadas para obtenção de um sobrenadante contendo a enzima cuja actividade se pretende determinar. O sobrenadante, colocado em microtubos, deve ser conservado em gelo para evitar perda de atividade enzimática por degradação da amostra.

B. Ensaio enzimático

A determinação da atividade de uma enzima por um método espectrofotométrico envolve a realização de um ensaio de cinética enzimática e de um ensaio de avaliação da concentração de proteína na amostra (Rodrigues, et al. 2013). Nesta atividade vais realizar o ensaio de cinética enzimática para perceber o princípio em que se baseia a utilização do método espectrofotométrico para avaliação da atividade da acetilcolinesterase como biomarcador de neurotoxicidade para avaliação da exposição à contaminação ambiental

1. Deixar a primeira coluna da microplaca vazia.
2. Pipetar 250 µl da reação de solução na coluna seguinte da microplaca (branco).

3. Realizar 4 réplicas por tratamento: pipetar 50 µl da amostra e adicionar 250 µl da reação de solução.
4. Esperar 10 minutos e ler a absorvância a 414 nm. Esperar 5 minutos e realizar uma segunda leitura. Esperar 5 minutos e realizar uma terceira leitura.

Princípio do Método

O princípio do método baseia-se na medição da taxa de produção da tiocolina como resultado da hidrólise da acetiltiocolina. Isto é obtido pela reação contínua do tiol com o ião 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o anião amarelo de 5-tio-2-nitro-ácido benzóico. A taxa de produção de cor é medida a 412 nm num fotómetro ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Referências

- Ellman, G.; Courtney, K.; Andres, V.; Featherstone, R. (1960). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95.
- Rodrigues, A. P.; Gravato, C.; Guimarães, L. (2013). Involvement of the antioxidant system in differential sensitivity of *Carcinus maenas* to fenitrothion exposure. *Environmental Science Processes & Impacts* 15(10):1938-48.

Monitorização ambiental e impacto da poluição

Registo da experiência

1. Formula e indica a hipótese a testar nesta experiência.
2. Nesta experiência a acetilcolina funciona como substituto de que neurotransmissor e é hidrolisada através da acção de que enzima?
3. Indica o que esperas que aconteça à célula pós-sináptica após hidrólise do neurotransmissor.
4. Porque é tão importante manter as amostras em gelo (4°C) durante os procedimentos para determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase.

5. No exemplo que se segue foram recolhidos caranguejos dos estuários dos rios Minho e Lima. Estes foram expostos no laboratório a diferentes concentrações do pesticida Fenitrotião. Analisa o gráfico seguinte e indica o que concluis relativamente às alíneas a. a d.:

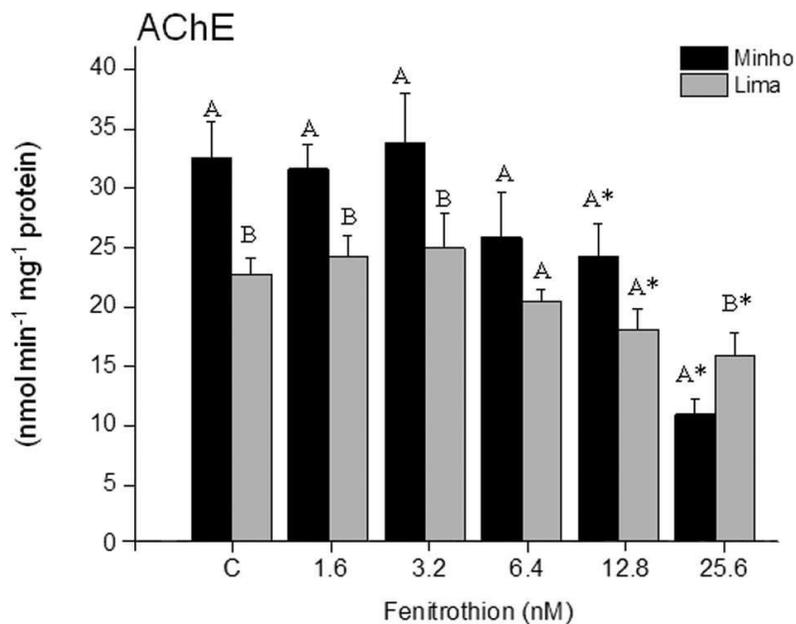


Figura 3: Média e correspondente erro padrão da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo do caranguejo-verde dos estuários do Minho e do Lima expostos durante 7 dias a fenitrotião.

- a. Comenta a seguinte afirmação: “O nível de atividade da enzima acetilcolinesterase determinado foi idêntico em todos os tratamentos testados (i.e. Controlo e diferentes concentrações de fenitrotião)”

b. O fenitrotião induz a atividade da acetilcolinesterase de modo dependente da concentração de exposição (i.e. relativamente ao grupo de animais controlo, a atividade aumenta com o aumento da concentração de fenitrotião a que os animais foram expostos).

c. Em que estuário consideras que o fenitrotião teve um efeito mais grave.

d. Relativamente aos animais do estuário do Minho expostos à concentração mais elevada de fenitrotião, o que podes concluir sobre a sua capacidade de obter alimento e/ou escapar aos predadores.

Guarda os teus resultados e escreve um mini artigo sobre a Monitorização ambiental e impacto da poluição para o nosso blog de ciências (<https://ciimarnaescola.wordpress.com/>).

Há um prémio para o melhor mini artigo. Sabe mais e explora os sítios da Literacia do Oceano e Kit do mar em <http://www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/oceanlab.php>

www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/OCEANLAB.php

Material abrangido por licença Creative Commons

