

Catarina Mateus Diniz
(Licenciada em Biologia)

Avaliação de métodos de deteção de genótipos de cianobactérias produtoras de cianotoxinas em amostras ambientais

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob orientação de:

Prof.^a Doutora Maria Margarida dos Prazeres Reis

Prof.^a Doutora Patrícia Alexandra Dias Brito Palma



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Catarina Mateus Diniz

Catarina Mateus Diniz

© Copyright: Catarina Mateus Diniz

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Catarina Mateus Diniz

Catarina Mateus Diniz

Agradecimentos

Chegou ao fim mais uma etapa da minha vida. Com ele chega, também, a hora de deixar o meu agradecimento a todos os que de alguma forma me acompanharam e ajudaram a alcançar mais um sucesso. Foram anos de muitas aventuras e desventuras em que cresci, mas acima de tudo em que conheci pessoas sem as quais, hoje, penso que estes anos não teriam sido o mesmo e talvez nem tivesse chegado onde cheguei.

Tenho de começar por agradecer à minha família porque sem eles tudo teria sido muito mais difícil. Mãe e pai um obrigada enorme por me terem “patrocinado” os estudos, agora tenho a noção do quão sortuda sou. Ao meu irmão, Bruno, obrigada pelo apoio, ainda que à maneira dele, foi fundamental. À avó Julieta e ao tio Carlos Jorge tenho de agradecer os mimos sempre na hora certa. Ao avô António embora já não estando fisicamente presente, será sempre a minha inspiração.

Obrigada à CrosSport e a todos os que fazem parte desta família, desde atletas a treinadores (Bruno, Ruben e Ricardo), pelas horas de riso e pelos treinos duros ao fim de cada dia, que tão úteis foram na hora de aliviar o stress.

À Sofia Arvela, muito mais do que uma amiga, uma irmã, não há palavras para descrever todos estes anos de amizade.

Ao Miguel e à Nate, amigos, conselheiros, irmãos...pessoas em relação às quais a frase “uma amizade de sempre e para sempre” diz tudo.

Obrigada ao Filipe, amigo e companheiro, pela paciência, pelo carinho, apoio e motivação.

Chegou finalmente a hora de agradecer à família do coração, que fui criando ao longo destes anos na UAIG:

- Às minhas Marias, Gisela Serrão e Joana (Falâncio) Teixeira, por todo apoio, pelas cantorias, pelas gargalhadas, pela presença, pelos 6 anos de amizade e pelos que, certamente, ainda virão;

- À Ana Portela que, apesar da distância física, esteve sempre presente;

- À Andreia Nunes e ao André Soares, por serem os melhores amigos que poderia ter, por pessoas a quem um simples obrigado não chega e duvido que alguma vez tenha palavras para lhes agradecer tudo o que aturaram ao longo destes anos, toda a ajuda, todo o apoio, tudo;

- Aos meus bóias lindos (Hélder Simões, Valter Martins, Eunice Pratas, Tony Lira) pelas horas de conversa da treta e de riso até às lágrimas, pelos cafés e jantares, pelas tardes na praia, pelos passeios e por estarem sempre presentes.

Às minhas orientadoras as Professoras Doutoras Margarida P. Reis e Patrícia Palma tenho de agradecer tudo o que me ensinaram, as oportunidades que me proporcionaram, desde

conhecer a albufeira de Alqueva como poucos a conhecem a um curso em Itália, a orientação e a “desorientação”. Aqui deixo o meu muito obrigada por terem feito com que começasse a acreditar nas minhas capacidades e me tornasse mais autónoma.

Ana Flor, Sandra Caetano, Carla Freitas, Cristina Costa, Maria Rodrigues, Telma Franco, Nuno Henriques (VWR), Floro (IPBeja) e Rocío López (IPBeja) obrigada por tudo o que ensinaram e pela vossa preciosa ajuda.

Obrigada à AquaExam, Lda., por me permitirem um livre acesso ao microscópio de inversão e por tudo o que me ensinaram. Obrigada ao Doutor Rodrigo Costa por me ter permitido utilizar equipamentos do seu laboratório.

A todos os referidos (e a alguém que me possa ter esquecido de referir) deixo o meu sincero agradecimento pela vossa presença e por todo o vosso apoio ao longo destes anos.

Resumo

As cianobactérias, bactérias aquáticas fotossintéticas, têm a capacidade de formar densas florescências, conhecidas como “Cyanobacteria Harmful Algal Blooms” (CyanoHABs). Estes levam ao decréscimo da qualidade da água, pela acumulação de escumas superficiais e por originarem eventos tóxicos, visto que muitas espécies podem produzir substâncias nocivas biologicamente ativas (cianotoxinas). As cianotoxinas, como cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxina (STX), têm uma vasta gama de mecanismos de toxicidade, como efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos e genotóxicos. Este grupo de moléculas pode ser quantificado por métodos de ELISA, HPLC ou LC-Ms/Ms, métodos que devido ao elevado custo comprometem a sua utilização regular em processos de monitorização.

A presença no fitoplâncton de espécies toxigénicas pode ser detetada através de genes especificamente associados à produção de toxinas. Por exemplo, a biossíntese de CYN é codificada por genes do grupo (*cluster*) *cyr* e a de STX depende do *cluster* de genes *sxt*. Por outro lado, vários autores têm referido a sensibilidade de alguns bioindicadores, utilizados em avaliação ecotoxicológica, como *Thamnocephallus platyurus* e *Daphnia magna* a estes agentes químicos de *stress*. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma associação entre ferramentas toxicológicas e a deteção de génotipos toxigénicos, *cyr* e *sxt*, no sentido de avaliar os riscos ambientais associados aos CyanoHABs, de uma forma mais rápida e economicamente viável.

Usou-se DNA extraído a partir de amostras ambientais frescas e preservadas, e de isolados de culturas, testando diferentes *primers* específicos para *cyr* ou *sxt* na amplificações de fragmentos daqueles genes. A presença de amplicões específicos para estes genes foi comparada com os dados ecotoxicológicos obtidos. Sendo a deteção transcriptómica da expressão destes operões ainda demasiado dispendiosa, e não garantindo a presença de genes a sua expressão, a associação das ferramentas ecotoxicológicas à deteção de génotipos toxigénicos parece ser um procedimento eficaz para ajudar a prever riscos associados a CyanoHABs.

Palavras-chave: CyanoHABs; Biologia Molecular; Ecotoxicologia; Avaliação de risco ambiental.

Abstract

Cyanobacteria are aquatic photosynthetic bacteria that may form dense blooms, known as Cyanobacteria Harmful Algal Blooms (CyanoHABs). These decrease water quality, may accumulate surface scums and originate toxicity events, since many species can produce harmful, biologically active substances. Cyanotoxins, like cylindrospermopsins (CYN) or saxitoxins (STX), may be quantified through ELISA assays, HPLC or LC-MS/MS, methods that lack cost effectiveness for regular use in toxicity screening. Such toxins have a wide range of toxicity mechanisms, with hepatotoxic, neurotoxic, cytotoxic and even genotoxic effects, and may thus be detected through the use of ecotoxicological assays. In fact, assays testing *Thamnocephalus platyurus* mortality or the inhibition of mobility and/or reproduction of *Daphnia magna* are known to successfully detect CYN and SXT toxicity. The presence of toxigenic species may also be assessed through the screening for toxin production genes among phytoplankton DNA. CYN biosynthesis is encoded by the *cyr* gene cluster and STX depends on the *sxt* gene cluster. Toxigenic *genera*, producing either CYN or STX have been detected in many environments. Thus, the main goal of this work was to evaluate the association of ecotoxicological tools with the detection of toxigenic *cyr* or *sxt* genotypes, in order to assess environmental risks linked to CyanoHABs. We used DNA extracted from fresh and preserved environmental samples, as well as from cultured isolates in PCR amplification, testing different sets of specific primers for *cyr* or *sxt*. The presence of specific amplicons for these genes was compared with acquired ecotoxicological data. While transcriptomic detection of the expression of *cyr* or *sxt* operons is still not cost effective, and gene detection doesn't guarantee their actual expression, the association of ecotoxicological tools to the detection of toxigenic genotypes seems the most effective procedure to help predict risks linked to toxicity of CyanoHABs events.

Keywords: Cyanobacteria; CyanoHABs; Cyanotoxins; Molecular Biology; Ecotoxicology.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Cianobactérias e CyanoHABs	1
1.2 Ordem Nostocales	4
1.2.1 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	5
1.2.2 <i>Chrysochloris ovalisporum</i>	6
1.2.3 <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	6
1.3 Cianotoxinas e sua produção	7
1.3.1 Cilindrospermopsinas	8
1.3.2 Saxitoxinas	9
1.3.3 Genes que codificam para cilindrospermopsinas e saxitoxinas.....	11
1.4 Métodos de detecção das toxinas.....	13
1.4.1 HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)	13
1.4.2 ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima).....	13
1.4.3 LC-MS/MS (Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem)	14
1.5 Avaliação indireta da toxicidade por cianobactérias	14
1.5.1 Detecção de genótipos toxigênicos	14
1.5.2 Avaliação ecotoxicológica.....	15
1.5.3 <i>Daphnia magna</i>	16
1.5.4 <i>Thamnocephalus platyurus</i>	16
1.5.5 <i>Vibrio fischeri</i>	17
2. Objetivos	18
3. Material e Métodos.....	20
3.1 Tarefas	20
3.2 Área de estudo	20
3.3 Recolha de amostras de água natural (amostras frescas) para identificação e quantificação de células de cianobactérias	22
3.4 Identificação e contagem do número de células	22
3.5 Tarefa I - Isolamento e manutenção em cultivo de estirpes ambientais de cianobactérias potencialmente produtoras e não produtoras de CYN e/ou SXT.....	23
3.5.1 Separação por citometria de fluxo ativada por fluorescência.....	23

3.5.2	Manutenção de cianobactérias ambientais em cultura	24
3.5.3	Observação microscópica e seleção dos isolados a cultivar.....	25
3.5.4	Ensaio de seleção variando a radiação	25
3.5.5	Ensaio de seleção variando a temperatura	25
3.5.6	Alterações ao meio BG11	26
3.5.7	Monitorização do crescimento das culturas por espectrofotometria	26
3.6	Tarefa II - Detecção dos genes <i>cyr</i> e <i>sxt</i> e sua diversidade	27
3.6.1	Extração de DNA.....	27
3.6.2	Tratamentos pré-extração de DNA.....	28
3.6.3	Detecção do DNA genómico extraído.....	29
3.6.4	Seleção de <i>primers</i>	30
3.6.5	Amplificações dos fragmentos de DNA alvo	31
3.7	Tarefa III - Rastreamento da toxicidade	34
3.7.1	Testes de disco-difusão em Agar.....	34
3.7.2	Ensaio ecotoxicológico.....	36
3.8	Tarefa IV – Validação da avaliação da toxicidade potencial.....	37
4.	Resultados	38
4.1	Identificação dos géneros e contagem de cianobactérias nas amostras naturais	38
4.2	Tarefa I.....	39
4.2.1	Separação por citometria de fluxo ativada por fluorescência.....	39
4.2.2	Ensaio de seleção variando a radiação	39
4.2.3	Ensaio de seleção variando a temperatura	40
4.2.4	Monitorização do crescimento das culturas com alterações ao meio BG11	41
4.3	Tarefa II	42
4.3.1	Tratamentos pré-extração de DNA.....	42
4.3.2	Seleção de <i>primers</i>	43
4.3.3	Amplificações dos fragmentos de DNA alvo	46
4.4	Tarefa III	52
4.4.1	Indução de condições de <i>stress</i> nas cianobactérias em cultura	52
4.4.2	Testes de disco-difusão em agar	53
4.4.3	Ensaio ecotoxicológico.....	54
5.	Discussão.....	56

5.1	Tarefa I.....	56
5.2	Tarefa II	57
5.3	Tarefa III.....	59
5.4	Tarefa IV.....	60
6.	Conclusão.....	61
7.	Referências Bibliográficas	63
8.	Anexos.....	77
	o Anexo I - Preparação do meio de cultura BG11	77
	o Anexo II – Solução de Vitaminas	79
	o Anexo III – Resultados das ampliações para genes associados à produção de cilindropermopsinas.....	80
	o Anexo IV – Resultados das ampliações para genes associados à produção de saxitoxinas.....	84

Índice figuras

Figura 1.2.1. 1 - Microfotografia de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2) de uma amostra da Ribeira de Alcarrache de Setembro de 2015, fixada em Lugol.....	5
Figura 1.2.2. 1 - Microfotografia de <i>Chrysochloridium ovalisporum</i> em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2) de uma cultura obtida a partir de uma amostra do Rio Ardila, em Setembro de 2015.	6
Figura 1.2.3. 1 - Microfotografia de <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 10x/0,25 Ph1) de uma amostra <i>in vivo</i> da albufeira do Arade (2010). Fotografia cedida por AquaExam, Lda.	7
Figura 1.3.1. 1 – Estrutura química de cilindrospermopsina.....	9
Figura 1.3.2. 1 – Estrutura química de Saxitoxina. “R” representa as posições variáveis.	11
Figura 1.3.3. 1 - Genes que codificam para CYN (A) e STX (B) em <i>C.raciborskii</i>	12
Figura 3.2. 1 - Localização geográfica das massas de água amostradas nos distritos de Beja e Faro.....	21
Figura 3.4. 1 - Sedimentação de uma amostra com recurso a uma câmara de sedimentação	23
Figura 3.5.4. 1 - Esquema da placa de 24 poços utilizada exposta, durante 30 minutos, a radiação UV a 365 nm, durante a realização dos ensaios de seleção por radiação.	25
Figura 3.5.7. 1 - Esquema da placa de 96 poços utilizada para a monitorização do crescimento das culturas por espectrofotometria.	27
Figura 3.6.3. 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Fermentas 1 kbp	30

Figura 3.7.1. 1 - Teste de disco-difusão em agar realizado com as culturas.	35
Figura 3.7.1. 2 - Teste de disco-difusão em Agar realizado com os sobrenadantes e <i>pellet</i> das culturas. L – cultura exposta a condições de stress; N – cultura mantida nas condições normais de crescimento; P – <i>Pellet</i> ; S – Sobrenadante.	35
Figura 4.2.2. 1 - Esquema da placa de 24 poços utilizada exposta, durante 30 minutos, a luz UV a 365 nm, durante a realização dos ensaios de seleção por radiação.....	40
Figura 4.2.4. 1 - Monitorização do crescimento das culturas de cianobactérias realizada para os 680 nm.....	41
Figura 4.3.1. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Cyan 108F e 377R para extratos de DNA obtidos por uma 1ª eluição com tampão e uma 2ª eluição com água ultrapura.....	42
Figura 4.3.1. 2 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Cyan 108F e 377R.	43
Figura 4.3.3. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Cyl 2 e Cyl 4.	48
Figura 4.3.3. 2 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> K18 e M5.	49
Figura 4.3.3. 3 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M4 e M5.	49
Figura 4.3.3. 4 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> NifH F e R.	50
Figura 4.3.3. 5 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Oct F e R.....	51
Figura 4.3.3. 6 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt B F e R.	51
Figura 4.4.1. 1 - Condições das culturas de cianobactérias.	52
Figura 4.4.2. 1 - Teste de disco-difusão em agar:.....	53

Figura 8. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> K18 e M5.....	80
Figura 8. 2- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> K18 e M5.....	80
Figura 8. 4- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M4 e M5.....	81
Figura 8. 3 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M4 e M5.....	81
Figura 8. 5 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M13 e M14.	82
Figura 8. 6 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M13 e M14.	82
Figura 8. 8 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Cynsulf F e Cynlam R.	83
Figura 8. 7 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> M13 e M14.	83
Figura 8. 9 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt A4 F e R.....	84
Figura 8. 10 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt A F e R.....	84
Figura 8. 12 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt W F e R.....	85
Figura 8. 11- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt N F e R.....	85
Figura 8. 13- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt V F e R.....	86
Figura 8. 14 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os <i>primers</i> Sxt X F e R.....	86

Índice tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura utilizada nos ensaios de seleção variando a temperatura	26
Tabela 2 - Condições das reações de PCR dos <i>primers</i> que têm como alvo os genes associados à produção de cilindrospermopsina	32
Tabela 3 – Condições das reações de PCR dos <i>primers</i> que têm como alvo os genes associados à produção de saxitoxina	33
Tabela 4 – Organismos observados após identificação microscópica.....	38
Tabela 5 – Densidade de cianobactérias (células/mL) em cada um dos locais de amostragem.....	39
Tabela 6 - Sequências selecionadas de <i>primers</i> específicos para os diversos ORFs alvo	44
Tabela 7 – Resultados das amplificações para genes associados à produção de cilindrospermopsinas, em que “+” indica uma amplificação positiva e “-“ indica que não houve qualquer amplificação.....	46
Tabela 8 - Resultados das amplificações para genes associados à produção de saxitoxinas, em que “+” indica uma amplificação positiva e “-“ indica que não houve qualquer amplificação.....	47
Tabela 9 - Densidade de cianobactérias (células/mL) em cultura em cada uma das condições de crescimento.	53
Tabela 10 - Toxicidade aguda das amostras de água em estudo nas espécies <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Thamnocephalus platyurus</i> e <i>Daphnia magna</i>	54
Tabela 11 - Toxicidade aguda das culturas de cianobactérias em estudo nas espécies <i>Vibrio fischeri</i> e <i>Daphnia magna</i>	55
Tabela 12 - Nutrientes que constituem o meio nutritivo BG11 e respectivas diluições adicionados à água desionizada estéril para a solução final	77
Tabela 13 - Nutrientes que constituem a solução de metais traço e respectivas diluições adicionados à água desionizada estéril para a solução final	78
Tabela 14 - Preparação das soluções <i>stock</i> das vitaminas B12 e B7 utilizando como solvente água destilada	79

Lista de abreviaturas

Bp – base pairs (pares de bases)

CyanoHABs - Cyanobacteria Harmful Algal Blooms

CYN – Cilindrospermopsina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução (High performance liquid chromatography)

ISO – Organização Internacional para a Padronização (International Standards Organization)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)

LD₅₀ - Dose letal mediana

LPS – Lipopolissacarídeos

MH – Müller-Hinton

NRPS – Sintetases peptídicas não ribossomais (Nonribosomal peptide synthetases)

ORF – Open-reading frame

PAR - Radiação fotossinteticamente ativa

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PET - Polietilenotereftalato

PKS – Policétido sintase (Polyketide synthases)

PSP – Intoxicação paralisante por marisco (Paralytic Shellfish Poisoning)

PSP - Toxinas paralisantes ingeridas com marisco (Paralytic Shellfish Poisons)

RNA – Ácido Ribonucleico

STX – Saxitoxina

TSA – Trypticase Soy Agar

UV – Radiação ultravioleta

OMS – Organização Mundial de Saúde

1. Introdução

As cianobactérias são procariotas fotossintéticos, sobretudo aquáticos, que incluem muitas espécies potencialmente tóxicas, sendo as principais cianotoxinas detetadas as microcistinas, as cilindropermopsinas (CYN) e as saxitoxinas (STX). A problemática do desenvolvimento destas populações tóxicas em águas de superfície destinadas a diversos usos (tais como consumo humano, rega ou recreio) tem vindo a despertar um crescente interesse tanto a nível da comunidade científica, como das entidades públicas gestoras da água. De facto, os riscos associados ao desenvolvimento de florescências de cianobactérias (em inglês “Cyanobacteria Harmful Algal Blooms” – CyanoHABs) incluem a eventual toxicidade para as espécies de ecossistemas dulçaquícolas e para as populações humanas que utilizam essas águas ^{1,2}.

A prevenção de riscos para a saúde pública envolve a monitorização dos CyanoHABs, mas a quantificação corrente de cianotoxinas, sendo onerosa, apenas se justifica perante a presença de espécies produtoras. A identificação morfológica destas espécies não é indicadora da toxina específica potencialmente produzida, dado que na mesma espécie se integram estirpes não produtoras e estirpes produtoras de diferentes toxinas. Assim, a deteção por métodos moleculares dos genes para a produção de uma destas toxinas, associada à efetiva deteção de toxicidade deveria contribuir para: (i) melhorar a previsão da potencial toxicidade dos CyanoHABs; (ii) minimizar custos analíticos na deteção de toxinas; (iii) otimizar esforços de monitorização; (iv) e proporcionar uma melhor avaliação de riscos, quer ambientais quer de saúde pública. Estas expectativas justificam os objetivos delineados para esta dissertação (cf. secção 2).

1.1 Cianobactérias e CyanoHABs

As cianobactérias, também conhecidas como “algas verdes e azuis”, compreendem, pois, um diverso grupo de bactérias Gram-negativas, geralmente, fotossintéticas oxigénicas que habitam uma vasta gama de ambientes terrestres e aquáticos. O seu crescimento para além de ser regulado por variáveis do tipo *bottom-up* (ou seja, pela competição por disponibilidade de nutrientes, intensidade da luz e temperatura) e variáveis do tipo *top-down* (isto é, pelo parasitismo e predação) ^{3, 4} é controlado por variáveis ainda mal conhecidas, que podem incluir a ativação de vírus

específicos ^{5, 6}. Estima-se que tenham surgido há cerca de 3,6 mil milhões de anos, e que tenham sido as primeiras produtoras de oxigénio na atmosfera primitiva ⁷.

Uma característica das cianobactérias é a sua ampla distribuição geográfica, que se reflete na sua variação genotípica e fenotípica, podendo apresentar-se de diversas formas, desde filamentos multicelulares, ovóides, esféricas e cilíndricas ⁸. Podem ser encontradas em ambientes límnicos e marinhos, mas a maioria das espécies coloniza habitats terrestres, onde, por serem importantes produtores primários, desempenham papéis cruciais nos processos dos ecossistemas e no ciclo dos nutrientes ^{7, 9}. Surgem também em ambientes extremos tais como oceanos ultraoligotróficos saturados em oxigénio, e em crostas do solo de áreas semiáridas ¹⁰. As cianobactérias também predominam nos sistemas de água doce, onde se conseguem multiplicar sustentadamente e, em condições favoráveis, formar florescências densas (designadas como *blooms*) à superfície. Estes CyanoHABs podem ser tóxicos, quando dominados por espécies produtoras de cianotoxinas, especialmente sob condições de eutrofização, isto é sob condições em que ocorre a acumulação de nutrientes, constituídos principalmente por compostos inorgânicos de fósforo (P) e azoto (N) ^{7, 11, 12, 13}. É sobretudo na sequência do aumento de nutrientes em águas superficiais, induzido por atividades humanas, que os CyanoHABs ocorrem ¹⁴, mas têm também sido detetados em sistemas prístinos ¹⁵. De facto, pensa-se que estes *blooms*, muitas vezes monoespecíficos ⁴, sejam causados por uma complexa interação entre as concentrações de nutrientes, a intensidade da luz solar, a temperatura elevada, a turbidez, o pH, a condutividade, a salinidade, a disponibilidade em carbono e as condições de águas estagnadas ou com pouca corrente ¹¹. Estes *blooms* apenas se tornam visíveis quando atingem elevadas concentrações de pigmentos ¹⁶, mas não existem diferenças, macro- ou microscópicas, entre *blooms* tóxicos e não tóxicos, dominados pela mesma espécie ⁸.

A formação de *blooms* tóxicos de cianobactérias já foi detetada para vários géneros de cianobactérias tais como *Microcystis*, pertencente à ordem Chroococcales, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, pertencentes à ordem Nostocales e *Oscillatoria* e *Lyngbya* pertencentes à ordem Oscillatoriales, entre outros ^{13, 17}. A formação de CyanoHABs por parte destes géneros leva geralmente à diminuição da qualidade da água, alteração do sabor e da cor, eventualmente com acumulação de escumas superficiais e à perda de valor recreacional e de pesca ^{11, 18, 19, 20}. As cianobactérias têm ainda a capacidade de explorar condições de estratificação da coluna de água, ao formarem vesículas gasosas, com origem proteica, que são estruturas ocas,

inertes, cheias de gás, que lhes conferem menor densidade do que a da água e promovem a sua flutuabilidade ^{21, 22}.

Uma das características destes *blooms* superficiais é o facto de manterem altas taxas de fotossíntese, mesmo sob elevada radiação ultravioleta, por a formação destas vesículas gasosas permitir a regulação da sua posição na zona eufótica. Mantêm-se próximas ou afastadas da superfície, em função da intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e da densidade do próprio *bloom* ^{21, 23}. Podem ainda contribuir para o aumento da temperatura superficial da água, devido à elevada absorção de energia da luz solar através dos vários pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores que possuem, como as clorofilas, os carotenóides e as ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina, e ficoeritrina) ^{21, 24}.

Muitas espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir uma grande quantidade de péptidos quimicamente diversos e com propriedades variadas, aplicáveis nas indústrias farmacêutica e alimentar e ainda na agricultura ⁹, isto é, substâncias biologicamente ativas que são coletivamente denominadas de metabolitos secundários ^{3, 13}. Estes compostos são sintetizados quando o crescimento natural e equilibrado cessa, podendo induzir respostas tóxicas. Estão também associados a efeitos a nível hormonal, antineoplásico e antimicrobiano para a população humana e animal, por afetarem ou inibirem algumas vias envolvidas na regulação fisiológica ^{3, 25, 26}. Os metabolitos secundários podem ter como função o armazenamento de azoto, a proteção contra radiação ultravioleta (UV), a quelação de metais, a defesa contra a predação ou a percepção de quórum (*quorum sensing*) ²⁷. Este último é um mecanismo regulado por elevadas densidades celulares, que resulta na modulação da expressão génica por meio de moléculas de sinalização química ^{28, 29}.

Microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas, anatoxinas e saxitoxinas são exemplos de alguns metabolitos secundários nocivos produzidos por cianobactérias, neste caso conhecidos por cianotoxinas ¹³. As cianotoxinas são consideradas um mecanismo de proteção, tendo-lhes sido atribuído, por diversos autores, um importante papel nos mecanismos de defesa química, seja por conferirem às cianobactérias vantagem na sobrevivência na predação por organismos de níveis tróficos superiores, seja por participarem na proteção contra fatores fisiológicos de stress ^{9, 30}.

De facto, a dispersão destas cianotoxinas em ambientes de água doce, é vista como uma séria ameaça à saúde humana e ambiental por contaminação da água e

potencial acumulação de toxinas na cadeia alimentar ou exposição a estas toxinas em atividades balneares e recreativas.

Nem todos os *blooms* de cianobactérias são tóxicos para as restantes espécies do ecossistema³¹. Isto pode dever-se a: (i) produção de baixas concentrações de toxina das estirpes e espécies responsáveis pelo *bloom*; (ii) baixa biomassa específica das espécies envolvidas; (iii) variação na sensibilidade das espécies; (iv) variações no volume de água ingerida pelos organismos, bem como a sua idade, sexo e a quantidade de alimento presente no seu sistema gastrointestinal³¹.

Visto poderem ocorrer *blooms* tóxicos e não tóxicos de uma mesma espécie, não é possível prever respostas fisiológicas à presença de espécies potencialmente toxigénicas³¹. Os fatores que influenciam a génese e toxicidade de CyanoHABs são também genéticos, visto existirem estirpes portadoras e não portadoras de genes associados à biossíntese de cianotoxinas³¹.

Apesar de serem conhecidos géneros de cianobactérias potencialmente produtores de toxinas pertencentes a várias ordens, este trabalho focar-se-á apenas na ordem Nostocales, uma vez que é onde se inserem as cianobactérias associadas à síntese de cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxina (SXT).

1.2 Ordem Nostocales

A ordem Nostocales é geralmente composta por cianobactérias formadoras de *blooms*. Membros desta ordem são encontrados em diversos ambientes aquáticos, como lagos e albufeiras de água doce, estuários, lagoas costeiras e no oceano. Muitas espécies desta ordem produzem potentes cianotoxinas que têm estado associadas a mortes de animais, deterioração da qualidade da água e contaminação de marisco³².

A capacidade de desenvolverem acinetos é uma característica que confere às espécies tóxicas, pertencentes a esta ordem, uma vantagem competitiva^{32, 33}. Este tipo de células de dormência resiste a rotas de dispersão longas, e a condições pouco favoráveis à sobrevivência das células vegetativas^{33, 34}. Além disso, a produção de células especializadas na fixação de azoto atmosférico, os heterocistos, favorece as suas capacidades invasoras em ecossistemas de águas oligotróficas e aumenta o espectro de ecossistemas passíveis de colonização, mesmo na ausência de fontes inorgânicas combinadas de azoto^{34, 35}.

Cylindrospermopsis raciborskii, *Chrysothrix ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, são exemplos de espécies filamentosas planctônicas de água doce pertencentes a esta ordem.

1.2.1 *Cylindrospermopsis raciborskii*

Comum em baixas latitudes e capaz de sintetizar toxinas perigosas tanto para humanos como para animais (STX e CYN) ³⁶, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosynska) Seenayya & Subba Raju (1972) ³⁷ cresce sob condições variadas. Tem na temperatura ambiente um fator limitante, situando-se a temperatura ótima de crescimento entre os 25 e os 35 °C. A germinação dos seus acinetos também é dependente da temperatura, ocorrendo apenas acima dos 22 °C ³⁶.

Apesar de comum em ecossistemas de água doce de regiões tropicais a subtropicais, esta cianobactéria tem vindo a ser detetada em regiões da Europa e América do Norte ^{38, 39}. Esta expansão da sua distribuição geográfica tem sido atribuída ao fenómeno do aquecimento global ⁴⁰, porém pode também dever-se ao aumento da eutrofização das águas ⁴¹.

Os tricomas desta espécie caracterizam-se por serem direitos ou ligeiramente curvos, variando o seu comprimento entre os 50 e 250 µm. Os heterocistos desenvolvem-se a partir das células terminais em uma ou em ambas as extremidades dos tricomas, são solitários, cónicos, pontiagudos ou arredondados nas extremidades ⁴² (Figura 1.2.1.1). Adjacentes ou não a estes surgem em muitos tricomas um ou mais acentos.



Figura 1.2.1. 1 - Microfotografia de *Cylindrospermopsis raciborskii* em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2) de uma amostra da Ribeira de Alcarrache de Setembro de 2015, fixada em Lugol.

1.2.2 *Chrysochlorum ovalisporum*

Entre as espécies produtoras de CYN reconheceu-se em 1994 ²⁰, *Chrysochlorum ovalisporum* (Forti) E.Zapomelová, O.Skácelová, P.Pumann, R.Kopp & E.Janecek (2012) ⁴³, anteriormente designada por *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti 1911), como também produtora de CYN. Esta espécie, para a qual se conhecem também estirpes não tóxicas ^{34, 35}, é considerada invasora e tem ampla distribuição. Tem vindo a desenvolver diferentes estratégias de sobrevivência em consonância com as mudanças climáticas a nível global, já tendo sido detetada na Europa, mais concretamente em Portugal (no âmbito deste trabalho) e em Espanha, Itália e Grécia ⁴⁴, Médio Oriente, Austrália e América do Norte ⁴⁵.

Trata-se de uma cianobactéria filamentosa em que o comprimento dos tricomas varia entre 50 e 500 µm, sendo frequentemente possível observar-se entre um e quatro heterocistos no meio de cada tricoma ²⁰. Acinetos de forma oval também são passíveis de ser visualizados quando as condições de crescimento são desfavoráveis ²⁰ (Figura 1.2.2.1).



Figura 1.2.2. 1 - Microfotografia de *Chrysochlorum ovalisporum* em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2) de uma cultura obtida a partir de uma amostra do Rio Ardila, em Setembro de 2015.

1.2.3 *Aphanizomenon flos-aquae*

Esta cianobactéria filamentosa, frequentemente encontrada em águas eutróficas de zonas temperadas ⁴⁶, tem uma temperatura ótima de crescimento acima dos 20 °C, sendo o seu crescimento dependente da intensidade da luz ⁴⁷ e associado a elevadas concentrações de fosfatos inorgânicos ⁴⁸.

Aphanizomenon flos-aquae Ralfs ex Bornet & Flahault (1886) ⁴⁹ tem um grande potencial de formação de *blooms* sazonais em sistemas de água doce e salobros (mar Báltico), tendo também a capacidade de produzir vários compostos bioativos, tais como

CYN e diferentes alcalóides neurotóxicos do grupo das STX, conhecidos como toxinas PSP (“Paralytic Shellfish Poisons”) ⁵⁰.

Estirpes de *A. flos-aquae* caracterizam-se pela presença de células distais hialinas, acinetos longos e cilíndricos, que podem atingir 91 µm, e por uma longa distância entre os heterocistos e os acinetos ⁵¹ (Figura 1.2.3.1).

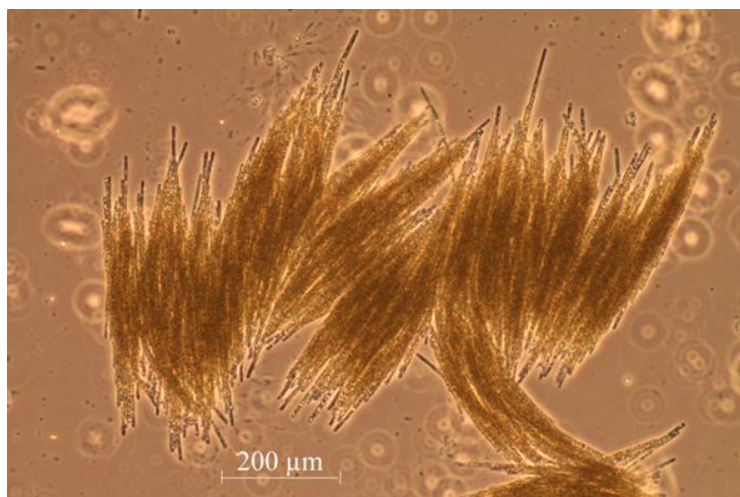


Figura 1.2.3. 1 - Microfotografia de *Aphanizomenon flos-aquae* em microscopia de contraste de fase (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 10x/0,25 Ph1) de uma amostra *in vivo* da albufeira do Arade (2010). Fotografia cedida por AquaExam, Lda.

1.3 Cianotoxinas e sua produção

As cianotoxinas são um importante grupo de compostos químicos do ponto de vista da ecotoxicologia, toxicologia e química ambiental, que podem influenciar a estrutura da comunidade de zooplâncton, especialmente quando as cianobactérias são dominantes no fitoplâncton ⁷. São metabolitos secundários tóxicos produzidos por cerca de 40 géneros de cianobactérias, entre os quais *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatoria (Planktothrix)* ¹¹. São consideradas contaminantes naturais e em geral são endotoxinas que se acumulam intracelularmente no citoplasma, sendo apenas libertadas aquando da lise celular ou excreção ¹. Consistem, sobretudo, num conjunto de toxinas naturais, com uma elevada gama de mecanismos de toxicidade, tendo efeitos a nível hepático, neuronal, dermatológico e citotóxico ^{3, 52}. Podem levar à inibição da síntese proteica e são, atualmente, consideradas potencialmente carcinogénicas ⁵³. São conhecidas por serem causa de envenenamentos severos, que podem levar a doenças crónicas, como cancro, e até morte ⁷.

As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com dois critérios: órgão afetado e estrutura química. Quanto ao primeiro, relativamente a vertebrados terrestres, especialmente mamíferos, são classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas ⁷. No que toca à sua estrutura química, são classificadas em péptidos cíclicos (microcistinas e nodularinas), alcalóides (cilindrospermopsinas, anatoxinas e saxitoxinas) e lipopolissacarídeos (LPS) ^{7, 52}. Considere-se ainda a anatoxina-*a(s)* que é o único composto organofosforado natural conhecido ⁵⁴.

Assim, as cianotoxinas podem ser definidas como biotoxinas responsáveis por envenenamentos agudos e crónicos de seres humanos e animais selvagens e/ou domésticos ¹¹.

1.3.1 Cilindrospermopsinas

Cilindrospermopsinas (CYN) são toxinas produzidas por cianobactérias de particular interesse devido à sua dispersão de ambientes tropicais para ambientes temperados, em aparente correlação com o fenómeno do aquecimento global, e cuja presença na Europa foi detetada pela primeira vez em 2002 ⁴⁰.

CYN são alcalóides cuja produção foi primeiramente identificada em *Cylindrospermopsis raciborskii*, em 1992 ²⁶. Desde então, outras espécies de cianobactérias como *Umezakia natans*, *Chrysoosporum ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chrysoosporum bergii*, *Anabaena laponica* e *Raphidiopsis curvata* já foram identificadas como produtoras desta toxina, o que indica que a produção desta toxina não é específica ^{1, 6, 7}. A ampla distribuição de espécies produtoras de CYN, juntamente com a sua capacidade invasora, ameaça vir a tornar-se um grave problema na gestão de águas superficiais interiores, à escala global.

Este alcalóide é altamente ativo a nível biológico, interferindo com várias vias metabólicas. Tem efeitos a nível hepatotóxico, citotóxico e genotóxico e é considerado como potencialmente carcinogénico ⁵⁵. A exposição a CYN pode levar ao desenvolvimento de tumores, indução de micronúcleos, perda de cromossomas ¹⁴ e danos a nível da estrutura dos cromossomas devido a danos no centrómero e no cinetocoro ⁴⁰. A toxicidade de CYN é mediada pela inibição da glutatona, um dos mais importantes antioxidantes do organismo humano ⁵⁶, e do citocromo P450 que participa na ativação da metabolização de compostos xenobióticos ⁵⁷. Consequentemente leva à inibição da síntese proteica e à apoptose, por inibir a tradução ribossomal ^{53, 40}.

Após a ingestão, a toxina afeta sobretudo o fígado através da inibição irreversível da síntese proteica, levando à morte celular ¹⁴. Em mamíferos, o envenenamento por CYN pode também causar danos a nível do rim, timo e coração ^{1,7}. Toxicidade ambiental, atividade antibacteriana, inibição do crescimento de plantas e macrófitas aquáticas e da germinação de pólen são outros dos efeitos de CYN ⁴⁰.

A LD₅₀ de CYN após administração intraperitoneal em ratinho é de 2,1 mg/kg de peso corporal ao fim de 24 horas e 0,2 mg/kg de peso corporal ao fim de 6 dias ^{14, 58}.

Atualmente encontram-se descritos dois análogos da CYN, a 7-epi-cilindrospermopsina, um epímero na ponte hidroxilo ligada ao carbono 7, e a 7-desoxi-cilindrospermopsina, que carece do átomo de oxigénio ligado ao mesmo carbono (Figura 1.3.1.1) ³. Estes compostos apresentam graus de toxicidade distintos, sendo CYN considerada a mais tóxica ⁵³.

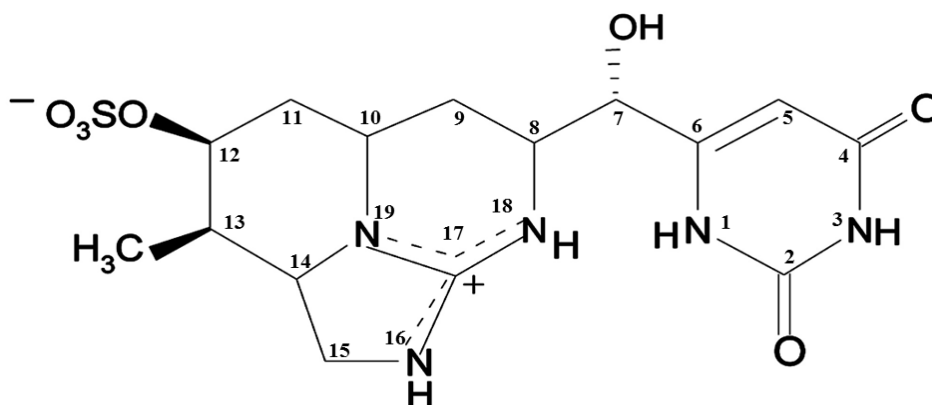


Figura 1.3.1. 1 – Estrutura química de cilindrospermopsina
(Adaptado de: Van Apeldoorn *et al.*, 2007)

1.3.2 Saxitoxinas

As neurotoxinas do grupo das saxitoxinas (STX) são conhecidas como toxinas PSP (“Paralytic Shellfish Poisons”), devido ao facto de os seus efeitos, principalmente intoxicações paralisantes por marisco (PSP – “Paralytic Shellfish Poisoning”) terem sido primeiramente descritos em humanos envenenados após consumo de bivalves contaminados ^{3, 7}. Muitos casos de envenenamentos em humanos estão associados à ingestão de marisco contaminado com saxitoxinas produzidas por dinoflagelados marinhos, responsáveis, por exemplo, por fenómenos como as marés vermelhas ⁷.

Os sintomas deste tipo de intoxicação em humanos surgem 30 minutos após a ingestão do alimento contaminado, e começam por formigueiros e ardor nos lábios, língua e garganta, aumentando até à total dormência da face ³. Outros sintomas podem passar por transpiração, vómitos e diarreia ³. Em casos de intoxicação aguda, a

dormência pode atingir o pescoço e as extremidades, e progredir para fraqueza muscular, perda de coordenação motora e paralisia³. A dose letal de saxitoxina resulta normalmente em falência cardiorrespiratória devido à paralisia muscular³.

Blooms de espécies produtoras de STX podem, assim, ser nocivos para humanos, animais aquáticos e terrestres²⁵, levando à contaminação das águas e a mortes em massa de peixes, de animais domésticos e selvagens. Estas neurotoxinas acumulam-se através da cadeia alimentar principalmente em organismos aquáticos filtradores, como os moluscos bivalves. Além destes, os crustáceos aquáticos são particularmente resistentes a estas toxinas, podendo acumular níveis perigosamente elevados de toxinas de PSP ao ingerirem plâncton tóxico³.

A capacidade de síntese de toxinas associadas a PSP tem uma distribuição ampla, e inclui organismos marinhos e dulçaquícolas de dois dos três ramos da árvore da vida (Bacteria e Eukarya). Este facto é considerado pouco comum, por, em geral, existir pouca convergência entre as estruturas dos metabolitos secundários de organismos provenientes de grupos filéticos tão afastados. A biossíntese de PSP em cianobactérias e dinoflagelados é consistente e uma característica herdada geneticamente³.

Estas cianotoxinas são um grupo de alcalóides neurotóxicos produzidos principalmente por dinoflagelados marinhos, dos géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium*, e cianobactérias de água doce, como *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon* sp., *Aphanizomenon gracile* e *Cylindrospermopsis raciborskii*^{3,25}.

A dose letal de STX resulta na paralisia dos músculos respiratórios, uma vez que a saxitoxina se liga aos canais de sódio e cálcio presentes nas membranas das células neuronais, impedindo a passagem dos iões através da membrana celular e bloqueando, assim, a transferência do impulso nervoso⁵³. Leva também à insuficiência cardíaca, visto tratar-se de um potente bloqueador dos canais de cálcio e potássio das células musculares do coração³. A ingestão de 1 mg desta ficotoxina é suficiente para causar a morte de um humano. STX conta com uma LD₅₀ de 10 µg/kg de peso corporal em ratinhos, após administração intraperitoneal³. Porém, os mamíferos podem possuir diferentes sensibilidades a esta toxina devido a uma única mutação na sequência de aminoácidos da subunidade alfa dos canais de sódio³.

A designação saxitoxina aplica-se ao composto principal do qual derivam 30 compostos, que diferem estruturalmente em quatro posições (R1 a R4 na Figura 1.3.2.1)⁵³. As goniautoxinas (GTX) são alguns dos compostos que derivam de STX³.

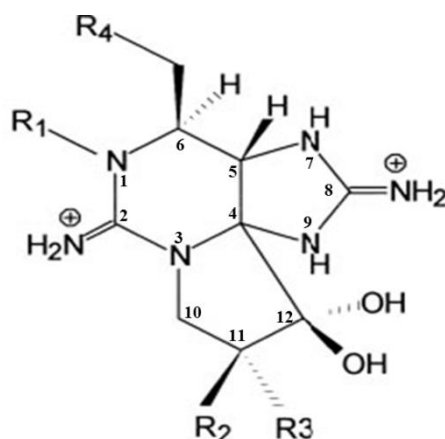


Figura 1.3.2. 1 – Estrutura química de Saxitoxina. “R” representa as posições variáveis.

(Adaptado de: Schantz, 1986)

1.3.3 Genes que codificam para cilindropermopsinas e saxitoxinas

A biossíntese destes compostos mesmo dos peptídicos (microcistinas e nodularinas) é realizada, por uma via não ribossomal, com recurso a complexos enzimáticos denominados NRPS (“nonribosomal peptide synthetases”) e PKS (“polyketide synthases”). Estas enzimas organizam de forma independente da transcrição e tradução do mRNA, as unidades funcionais repetitivas (módulos), que são sucessivamente adicionadas de modo a constituir a molécula final da cianotoxina¹⁹.

NRPS e PKS encontram-se no grupo (*cluster*) de genes associados à produção de toxinas e, geralmente, são codificadas numa mesma ORF (“Open-reading frame”)¹⁹,⁵⁹. Cada módulo de PKS ou NRPS é constituído por um conjunto de três domínios, que atua nas reações centrais de formação de cadeias na biossíntese do policetídeo ou do polipéptido: um domínio de adenilação responsável pelo reconhecimento e ativação dos aminoácidos, um domínio que atua como transportador sendo constituído por uma proteína transportadora de péptidos (denominado de domínio PCP - "Peptidyl Carrier Protein") sendo responsável pelo transporte para o respetivo centro catalítico e, finalmente, por um domínio de condensação, responsável pela formação da ligação peptídica ou policetídica¹⁹.

O *cluster* de genes *cyr* associado à biossíntese de CYN em estirpes de *C.raciborskii* é codificado por cerca de 42 kb e codifica para 15 ORFs (“Open-reading frame”), nomeadas de *cyr* A a *cyr* O⁵⁹. Este *cluster* contém os genes necessários para a

biossíntese (*cyr A*, *cyr D*, *cyr F*, *cyr B*, *cyr E*, *cyr C*, *cyr I*, *cyr J* e *cyr N*), regulação (*cyr O*) e exportação de CYN (*cyr K*)¹⁹ (Figura 1.3.3.1 A).

Quanto ao *cluster* de genes associado à biossíntese de STX pouco se conhece. Sabe-se que é mais pequeno que o *cluster cyr*, sendo codificado por cerca de 35 kb, e que codifica para 31 ORFs *sxt*⁵⁹ (Figura 1.3.3.1 B).

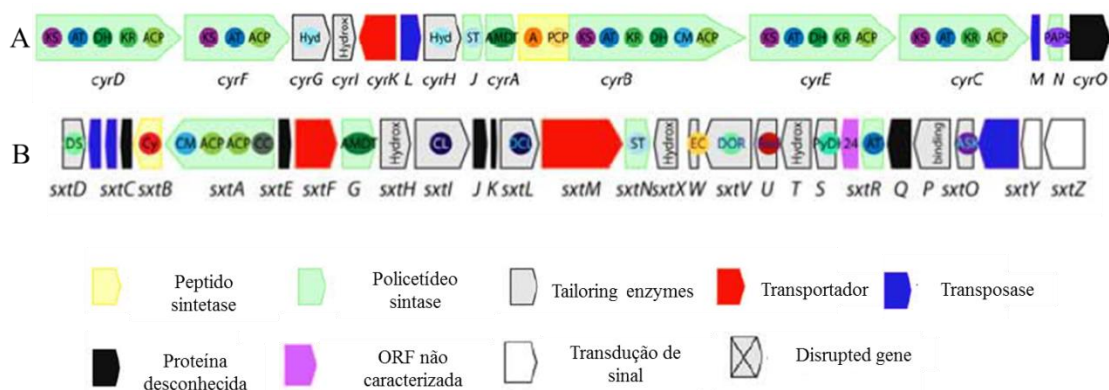


Figura 1.3.3. 1 - Genes que codificam para CYN (A) e STX (B) em *C.raciborskii* (Adaptado de: Valério *et al.*, 2010)

Através da realização de testes que recorrem à reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) convencional, é possível, de uma forma rápida e sensível detetar alguns destes genes associados à biossíntese de CYN e STX, e assim, detetar populações de cianobactérias potencialmente tóxicas em massas de água. Para a realização deste tipo de testes é, apenas, necessária a utilização de *primers* (fragmento de DNA iniciador) específicos para genes destes *clusters*⁶⁰.

Apesar dos avanços na genética molecular de diversas espécies de cianobactérias terem vindo a revelar o conjunto de genes que codificam a produção de CYN e STX, os fatores determinantes da expressão destes genes são, ainda, desconhecidos, uma vez que nem sempre a presença do genótipo implica a sua expressão fenotípica¹⁴. No entanto, não existe produção de cianotoxinas na ausência daqueles genes, pelo que importa poder diferenciar, em amostras naturais, as espécies portadoras do genótipo que as torna potencialmente tóxicas, das que não podem produzir toxinas. Tal implica a adaptação de técnicas laboratoriais bem estabelecidas ao uso em amostras naturais, com matrizes bem diversificadas, e a aferição da sua fiabilidade.

1.4 Métodos de detecção das toxinas

Na literatura encontram-se descritos diversos métodos (físico-químicos, biológicos e analíticos) para detecção das cianotoxinas em amostras de água e culturas de células de cianobactérias ⁶¹. O recurso a métodos analíticos para detetar a presença destes metabolitos tem vindo a ganhar cada vez mais adeptos, visto que para além de permitirem a quantificação das cianotoxinas, permitem também uma detecção mais sensível e específica ⁶².

O rastreio destas cianotoxinas em massas de água é, frequentemente, efetuada de forma rápida com recurso a métodos imunológicos, nomeadamente por ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima). Métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e mais recentemente a cromatografia líquida associada a espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) também têm vindo a ser empregues na sua quantificação ^{61, 63}. Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens que se discutem de seguida.

1.4.1 HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)

É a técnica analítica de separação mais usada. A razão da sua popularidade deve-se à sua capacidade de efetuar determinações precisas e separar compostos não voláteis, e ao facto de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e investigação científica. Mas, é uma técnica dispendiosa que requer o uso de grandes quantidades de reagentes e tem uma baixa sensibilidade para compostos mais simples ^{64, 65}, sobretudo quando aplicada a amostras naturais em que as percentagens de recuperação destes compostos pode ser fortemente afetada pela composição da matriz da amostra ⁶¹.

1.4.2 ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima)

Este imunoensaio enzimático (EIA – “Enzyme Immunoassay”) é uma técnica bioquímica usada sobretudo em imunologia, para detetar a presença de um anticorpo ou antigene numa amostra.

Tem especificidade e sensibilidade suficiente para detetar mesmo quantidades mínimas de toxina, mas é suscetível a erros por reatividades cruzadas originando falsos positivos e exige sempre confirmação cromatográfica ^{66, 67, 68, 69}. Os *kits* comerciais de ELISA para cianotoxinas conhecidas parecem ser uma alternativa promissora, mas são

ainda muito dispendiosos sobretudo quando o número de amostras a analisar é reduzido⁷⁰.

1.4.3 LC-Ms/Ms (Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem)

É uma poderosa ferramenta para a análise de vários analitos numa grande variedade de matrizes. Trata-se de uma técnica adequada para a monitorização de cianotoxinas, mesmo que estas se encontrem em baixas concentrações nas amostras de água. Ainda assim, é uma técnica dispendiosa que requer um grande investimento em equipamentos e os resultados entre laboratórios podem não ser comparáveis se as técnicas de extração e os métodos de análise não tiverem sido intercalibrados^{71, 72, 73, 74}.

1.5 Avaliação indireta da toxicidade por cianobactérias

A monitorização indireta da toxicidade por cianobactérias é em geral estimada pela identificação da componente fitoplanctónica natural das águas, da qual as cianobactérias fazem parte. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), valores abaixo das 20.000 células de cianobactérias/mL em águas recreativas, acarretam um risco baixo de efeitos adversos a curto prazo, tais como irritações dérmicas ou doenças gastrointestinais, em adultos saudáveis⁷⁵. Para valores de células cianobacterianas superiores a 20.000 células e inferiores a 100.000 células/mL, existe já um risco moderado de efeitos adversos a curto prazo, além da possibilidade de se observarem efeitos adversos a longo prazo em adultos saudáveis, dependendo das espécies presentes⁷⁵. A possibilidade de intoxicações agudas e efeitos adversos a longo prazo representa um grau de risco elevado, em locais onde ocorra formação de escumas e haja risco de contacto direto, inalação ou ingestão da água⁷⁵.

Em águas para produção de água potável, o primeiro nível de alerta que determina a necessidade de rastrear a presença de toxinas é de 2.000 células/mL²³

Nenhum destes valores guia discrimina entre espécies efetivamente tóxicas e não tóxicas, mas na prática tornou-se corrente avaliar o risco de toxicidade por cianobactérias avaliando apenas a densidade das espécies potencialmente toxigénicas.

1.5.1 Deteção de genótipos toxigénicos

Na deteção de genótipos toxigénicos, os testes têm como alvo os genes associados à biossíntese de cianotoxinas, sendo possível, de uma forma rápida e

sensível, detetar populações de cianobactérias potencialmente tóxicas em massas de água ⁷⁶. O facto de a presença do gene não implicar que ocorra produção de toxina, e existir a necessidade de avaliar impactos de eventuais inibidores de PCR provenientes das amostras ambientais são as desvantagens associadas a este método.

1.5.2 Avaliação ecotoxicológica

A fim de se detetar os efeitos destas toxinas, recorre-se a ensaios ecotoxicológicos que são usados devido à sua elevada sensibilidade com indicação de potenciais impactos nos ecossistemas. Mas, a sua falta de especificidade torna muito difícil a associação dos resultados a uma toxina específica em amostras naturais ^{77, 78, 79}. No entanto, na presença de espécies potencialmente toxigénicas resultados positivos nestes ensaios poderão vir a ser indicadores da expressão dos génotipos detetados.

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser utilizados para estimar a toxicidade de amostras ambientais como águas, solos ou sedimentos ⁸⁰. Este tipo de testes, também conhecidos como bioensaios, são ainda usados para determinar a quantidade de uma substância a que um organismo pode ser exposto para antever efeitos adversos ⁸⁰. Poder-se-á, assim, estabelecer a relação entre as concentrações dos parâmetros químicos e de substâncias perigosas com os efeitos biológicos observados em várias espécies do ecossistema ⁸¹.

A escolha do organismo de teste é de vital importância para a validade do teste. É necessário que se tenha informação acerca das vantagens e desvantagens associadas às espécies testadas, e, frequentemente, recomendado que estas representem diferentes níveis tróficos ^{80, 82}. Na deteção de cianotoxinas, a sensibilidade de alguns bioindicadores, utilizados em avaliação ecotoxicológica, como *Thamnocephallus platyurus* e *Daphnia magna* ⁸³ poderá vir a contribuir para a monitorização da qualidade da água. Neste tipo de avaliação recorre-se a ensaios de exposição aguda e/ou a ensaios de exposição crónica, dependendo dos efeitos que se pretende analisar ^{84, 85}.

Os ensaios de exposição aguda, como os ensaios de mortalidade com *D. magna* ou *T. platyurus* e de inibição de luz com *Vibrio fischeri*, são testes rápidos que precedem os ensaios de exposição crónica, sendo, por isso, considerados métodos de *screening* na avaliação toxicológica ^{84, 85}. A imobilidade, mortalidade e luminescência, são alguns dos parâmetros avaliados neste tipo de bioensaio ⁸⁵.

Os ensaios de exposição crónica avaliam os efeitos resultantes da exposição aos fatores de stress durante a totalidade do ciclo de vida da espécie, tendo a taxa de

reprodução, crescimento, frequência de mudas e malformações embrionárias ⁸⁵, como parâmetros de avaliação.

Por se tratarem de invertebrados com ciclos de vida, que apesar de curtos, são suficientemente longos para permitirem a detecção de alterações ambientais de curto prazo, por serem fáceis de identificar quando comparados com algas ou bactérias, por possuírem movimentos de dispersão reduzidos, por terem regimes alimentares diversos e por estarem presentes numa grande variedade de biótopos ^{86, 87}, *D. magna* e *T. platyurus* são comumente usados na caracterização do meio aquático.

1.5.3 *Daphnia magna*

Trata-se de um crustáceo de água doce da ordem Cladocera, também conhecido como pulgas de água ⁸⁰.

São organismos bastante utilizados em testes de toxicidade por se encontrarem amplamente distribuídos nas massas de água doce, serem importantes em muitas cadeias alimentares e por serem uma fonte significativa de alimento para peixes ⁸⁰. O facto de possuírem um ciclo de vida relativamente curto, serem facilmente cultivados e mantidos em laboratório, serem sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático e terem dimensões reduzidas, permitindo a utilização de menores volumes de amostra e água de diluição do que os testes realizados com algas e peixes, são características que fazem com que *D. magna* seja cada vez mais usada neste tipo de análises ^{80, 88}. A sua reprodução assexuada, por partenogénese, garante organismos geneticamente idênticos permitindo, assim, a obtenção de organismos-teste com sensibilidade similar ⁸⁰.

1.5.4 *Thamnocephalus platyurus*

T. platyurus, um crustáceo de água doce pertencente à ordem Anostraca, é usado como organismo-teste nos bioensaios devido ao nível trófico que ocupa nos ecossistemas aquáticos e por se tratar de um bom modelo para prever a toxicidade de químicos e poluentes nos ecossistemas ⁸⁹. Comparado com *D. magna*, este invertebrado é considerado particularmente sensível a inúmeros químicos e poluentes ambientais ^{90, 91}, e fácil de usar como bioindicador ^{89, 91}.

Por ser um consumidor primário nas teias alimentares aquáticas, esta espécie tem uma elevada importância a nível científico e ecológico ⁸⁹.

1.5.5 *Vibrio fischeri*

V. fischeri é uma bactéria marinha heterotrófica, Gram-negativa pertencente à família Vibrionaceae, que pode ser encontrada em águas de regiões temperadas e subtropicais ^{92, 93}.

Trata-se de uma bactéria luminescente frequentemente encontrada em relações simbióticas com animais marinhos. A sua bioluminescência é dependente de *quorum sensing* e da expressão de cinco genes, *lux CDABE*, regulados por *lux R* e *lux I*, que compõem o operão *lux* ⁹³.

Esta bactéria é usada para avaliar a toxicidade da água induzida por amostras ambientais, visto que a redução da luz emitida é proporcional aos efeitos inibitórios produzidos pela amostra no crescimento da bactéria ⁹³.

Assim, no rastreamento da toxicidade de cianobactérias, têm sido usados organismos indicadores, como *Artemia salina* ⁹⁴ ou *Daphnia spp* ⁹⁴. No entanto, estes métodos de rastreamento, com organismos aquáticos, têm-se concentrado maioritariamente na detecção de microcistinas e nodularinas ⁹⁵. Recentemente, alguns estudos apontam para o potencial uso de espécies de cladóceros (ex: *Daphnia magna*) para a detecção de saxitoxinas na água, dada a sua sensibilidade ⁹⁶. Uma variedade de efeitos no zooplâncton, em especial sobre o grupo dos cladóceros, tais como sobrevivência, crescimento, fecundidade e comportamento alimentar ⁹⁶, têm sido descritos após exposição a cianobactérias. Estes estudos indicam que a utilização deste grupo de bioindicadores pode ser uma mais-valia na despistagem do seu risco ambiental.

2. Objetivos

O objetivo global deste trabalho consistiu em verificar a viabilidade de incluir na monitorização de amostras naturais a associação de ferramentas ecotoxicológicas com a deteção de génotipos específicos de cianobactérias potencialmente produtoras de cianotoxinas. Como se disse na secção 1 pretendeu-se contribuir para (i) a melhoria da previsão da potencial toxicidade de CyanoHABs; (ii) a minimização de custos analíticos na deteção de toxinas; (iii) a otimização do esforço de monitorização; (iv) e uma melhor avaliação de riscos quer ambientais quer de saúde pública.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi contribuir para uma melhor avaliação do risco associado a CyanoHABs, em particular dos frequentemente dominados por espécies dos géneros *Aphanizomenon*, *Chrysochloris* e *Cylindrospermopsis*, considerados como potencialmente produtores de CYN e STX. Para tanto, foi necessário utilizar métodos que permitissem diferenciar os génotipos de cianobactérias produtoras de CYN e/ou STX, adaptando a sua aplicação a amostras naturais, frescas e preservadas, de modo a analisar casos de CyanoHABs previamente caracterizados.

No sentido de cumprir este objetivo delinear-se os seguintes objetivos específicos:

- a) Isolamento e manutenção em cultura de cianobactérias filamentosas potencialmente produtoras de CYN e STX, destinadas a servir de controlo positivo em todas as análises ambientais;
- b) Rastreamento da eventual produção de CYN e STX através de bioensaios com organismos indicadores do grupo dos cladóceros e bactérias;
- c) Implementação de métodos moleculares de amplificação de sequências específicas dos genes associados à produção de CYN e STX;
- d) Verificação da sua aplicabilidade em amostras naturais;
- e) Comparação de avaliações de risco realizadas com e sem recurso a esta metodologia.

O cumprimento destes objetivos permitirá responder às seguintes questões:

- 1) Serão os isolados de cianobactérias filamentosas das albufeiras do sul de Portugal mantidos em cultura portadores dos genes *cyr* e/ou *sxt*?

- 2) Existem genótipos *cyr* e/ou *sxt* nas amostras de CyanoHABs das albufeiras do sul de Portugal (Alqueva, Bravura, Funcho, Odeleite e Beliche)? E em que proporção?
- 3) Será possível obter uma avaliação de risco de toxicidade mais fiável através da diferenciação genotípica da toxicidade potencial de cianobactérias?
- 4) Será possível a análise retrospectiva da toxicidade potencial de amostras fixadas através da diferenciação de genótipos *cyr* e *sxt*?
- 5) Em que medida este tipo de abordagem permitirá o posterior desenvolvimento de ensaios ambientais que detetem diretamente a expressão dos genes em causa?

Entre as várias cianotoxinas conhecidas, neste projeto optou-se pela avaliação de risco e o desenvolvimento de metodologias de deteção dos genótipos associadas à síntese de cilindropermospinas e saxitoxinas, cianotoxinas que têm sido detetadas em massas de água portuguesas⁹⁷ e sobre as quais existe pouca informação científica.

3. Material e Métodos

A fim de se cumprir os objetivos propostos delinear-se quatro tarefas numeradas de I a IV.

3.1 Tarefas

- **Tarefa I**

Realizou-se o isolamento e manutenção em cultivo de estirpes ambientais de cianobactérias potencialmente produtoras e não produtoras de cilindrospermopsinas e/ou saxitoxinas, para, deste modo, se obter controlos positivos e negativos para genes *cyr* e *sxt* em cultivos.

- **Tarefa II**

Foi realizada a deteção dos genes *cyr* e *sxt* e sua diversidade com recurso a amostras preservadas, amostras frescas e às culturas em crescimento.

- **Tarefa III**

Com o desenvolvimento desta tarefa pretendeu-se avaliar a toxicidade associada à expressão dos genes *cyr* e *sxt* em amostras frescas, preservadas e cultivos. Deste modo, foram realizados ensaios ecotoxicológicos agudos, a partir de amostras frescas e das culturas, nomeadamente: Teste de inibição de mobilidade com *Daphnia magna*⁹⁸, Teste de mortalidade com o crustáceo *Thamnocephalus platyurus*^{99, 100} e Ensaio de inibição de luz com a bactéria *Vibrio fischeri*^{101, 102}. Os resultados obtidos foram comparados com os de ensaios realizados anteriormente nas amostras preservadas em uso.

- **Tarefa IV**

Foi realizada a integração dos resultados obtidos nas respostas às tarefas realizadas.

3.2 Área de estudo

A área de estudo incluiu as principais albufeiras do distrito de Faro, nomeadamente Bravura, Arade, Funcho, Odeleite e Beliche e um conjunto de massas de água do distrito de Beja, associadas ao Empreendimento de fins múltiplos de Alqueva, gerido pela Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva (EDIA).

As colheitas no Distrito de Faro foram todas providenciadas pela Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. (APA), através dos serviços da Administração da Região Hidrográfica do Algarve (ARH-Algarve), cuja colaboração se agradece.

Posteriormente e perante a ausência das espécies alvo, nas amostras recolhidas nas albufeiras do Algarve, foram realizadas recolhas de amostras de água natural em nove pontos do Baixo Alentejo, Sul de Portugal, assinalados na Figura 3.2.1.

Cinco dos pontos amostrados, Marina da Amieira, Ribeira de Alcarrache, Monsaraz, Telheiro, Mourão e Cais ancoradouro de Monsaraz, pertencem à albufeira de Alqueva. Os principais usos para a água desta albufeira, localizada na bacia hidrográfica do Guadiana, são a rega, a produção de energia hidroelétrica e o abastecimento das populações ¹⁰³. A Barragem do Enxoé, também localizada na bacia hidrográfica do rio Guadiana, visa a manutenção do caudal ecológico, o abastecimento de populações e a criação de uma reserva de água ¹⁰⁴. A Barragem do Roxo, apesar de localizada na bacia do Sado, encontra-se ligada à albufeira de Alqueva, o que permite manter estáveis os níveis de água para consumo humano, regadio e desportos náuticos ¹⁰⁵.

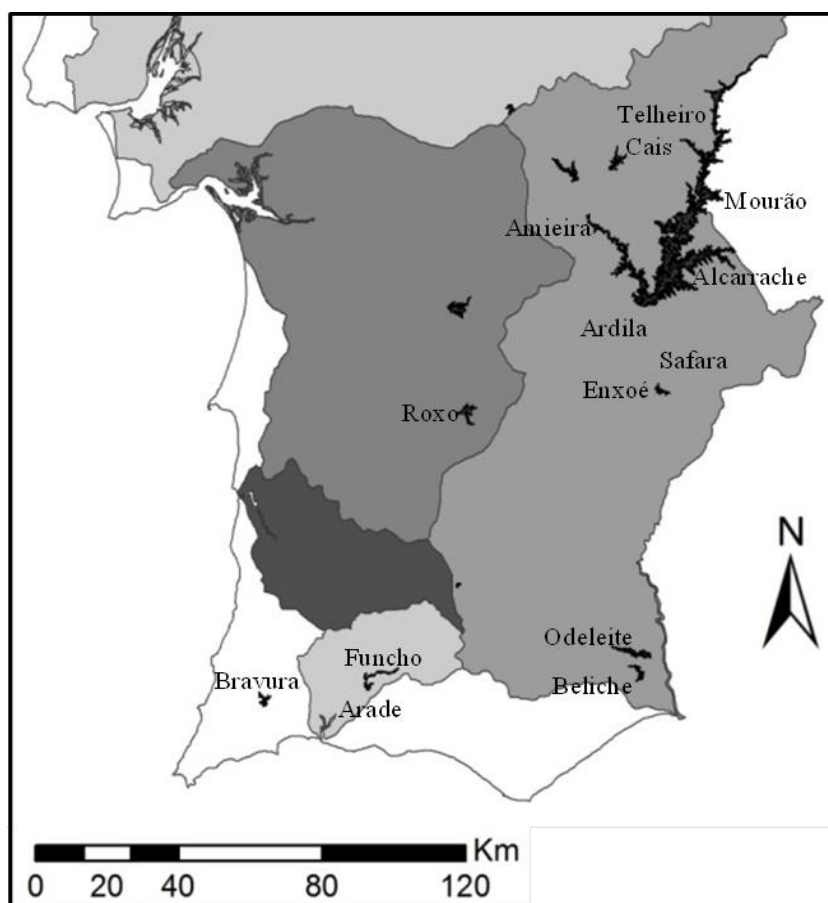


Figura 3.2. 1 - Localização geográfica das massas de água amostradas nos distritos de Beja e Faro.

O rio Ardila nasce em Espanha, na serra de Tentúdia, e tem uma extensão de 60 km até desaguar no Guadiana ¹⁰⁶. Este rio é considerado um dos mais poluídos, sendo classificado como crítico no sistema Alqueva – Pedrógão por trazer, desde Espanha, excesso de matéria orgânica e nutrientes, promotores da sua eutrofização ¹⁰⁷, e concomitante potencial seleção de estirpes tóxicas ^{21, 61}. A ribeira de Safara, que desagua no rio Ardila, é um curso de água português, localizado no concelho de Moura, no distrito de Beja ¹⁰⁸.

3.3 Recolha de amostras de água natural (amostras frescas) para identificação e quantificação de células de cianobactérias

Foram recolhidas amostras de água em todos os locais assinalados na Figura 3.2.1, locais onde em trabalhos anteriores ⁴¹ foram identificadas cianobactérias com capacidade de produzir toxinas.

No distrito de Faro, as colheitas foram realizadas pela APA - ARH Algarve de acordo com os métodos de amostragem recomendados pelo ex-INAG (atual APA – Instituto da Água) ¹⁰⁹, em 23 e 24 de fevereiro e 20 e 21 de julho de 2015.

No distrito de Beja, cada local de amostragem foi visitado quer a 18 quer a 25 de setembro de 2015, realizando-se as amostragens a partir de cais ancoradouros quando estes existiam, ou a partir da margem, com a menor perturbação possível da zona para não contaminar as amostras com sedimentos. Estas colheitas realizaram-se com recurso a um garrafão de 5 Litros (L) em polietilenotereftalato (PET) e a uma garrafa de 1,5 L do mesmo material. Estes contentores foram de imediato colocados em gelo e no escuro e transportados para o laboratório, onde as amostras foram subdivididas em recipientes de menor volume (1,5 L), e congeladas até à realização dos testes ecotoxicológicos no Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto Politécnico de Beja. Foram também recolhidas três alíquotas para tubos tipo *Falcon* de 50 mL: uma com 35 mL, que foi congelada para posterior da extração de DNA, e outras duas com 50 mL, das quais uma foi fixada com Lugol, com vista à observação em microscopia de inversão ¹⁰⁹, tendo a terceira sido destinada ao cultivo em BG11.

3.4 Identificação e contagem do número de células

Previamente a iniciarem-se as análises molecular e ecotoxicológica das amostras naturais, realizou-se uma breve análise quantitativa do fitoplâncton presente. Tendo em conta o objetivo deste trabalho, esta análise consistiu na identificação de cianobactérias

potencialmente tóxicas, dos géneros *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon* ou *Chrysochromum*, determinação da densidade e cálculo do biovolume dos organismos pertencentes a estas *taxa*. Assim, com recurso ao microscópio ótico de contraste de fase (Leitz, Laborlux K, condensador ACHROPLAN) realizou-se um primeiro rastreio (*fast screening*) das amostras que permitiu selecionar as que melhor se enquadravam nos objetivos deste trabalho. Em seguida, e com recurso a câmaras de sedimentação realizou-se a sedimentação destas amostras. Esta câmara consiste numa coluna vertical, preenchida, neste caso, com um volume de 10 mL da amostra fixada com Lugol, com uma base através da qual o seu conteúdo pode ser observado com recurso ao microscópio de inversão, permitindo que as partículas sedimentem no fundo da câmara devido à força gravítica ¹⁰⁹ (Figura 3.4.1).

Em microscopia de inversão (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2), procedeu-se à contagem por quadrículas, como descrito no “Manual para a Avaliação da Qualidade Biológica da Água em Lagos e Albufeiras segundo a Directiva Quadro da Água - Protocolo de Amostragem e análise para o Fitoplâncton”, e posteriormente ao cálculo da densidade de cianobactérias ¹⁰⁹.



Figura 3.4. 1 - Sedimentação de uma amostra com recurso a uma câmara de sedimentação

3.5 Tarefa I - Isolamento e manutenção em cultivo de estirpes ambientais de cianobactérias potencialmente produtoras e não produtoras de CYN e/ou SXT

Tendo como objetivo o isolamento, purificação e a manutenção em cultivo de estirpes ambientais de cianobactérias potencialmente produtoras e não produtoras de CYN e/ou STX, para obtenção de controlos positivos e negativos da presença dos genes *cyr* e *sxt*, realizaram-se diversos cultivos de cianobactérias. Estes foram submetidos a diversos procedimentos e condições de modo a selecionar as espécies alvo a partir de culturas e amostras que não eram axénicas nem unialgais.

3.5.1 Separação por citometria de fluxo ativada por fluorescência

O citómetro de fluxo utilizado (BD FACSAriaTM II) permitiu selecionar apenas as células que apresentavam fluorescência correspondente à emissão quer por clorofila *a*

(excitação 440 nm e emissão a 685 nm), quer por ficocianina (excitação a 617 nm e emissão a 646 nm). Estas foram separadas em dois grupos de acordo com a sua dimensão. Tratando-se da separação de espécies de cianobactérias filamentosas, foram utilizados dois critérios para o isolamento destas microalgas: presença de ficocianina e tamanho dos tricomas.

Para a receção das células isoladas foram previamente preparadas, na câmara de fluxo laminar, placas de 24 poços com 2 mL por poço de meio BG11 com adição de vitaminas (ver secção 3.5.2). Assim, foram separados da amostra e acumulados em cada poço os tricomas que continham ficocianina e a dimensão definida. As placas obtidas foram incubadas, - nas condições acima mencionadas -, no fitoclima.

3.5.2 Manutenção de cianobactérias ambientais em cultura

Os cultivos preliminares das estirpes a utilizar foram mantidos e purificados em meio BG11 ¹¹⁰ (Anexo I - Preparação BG11), modificado de acordo com Ripka *et al.* ¹¹¹, com adição de solução de vitaminas formulada por Guillard *et al.* ¹¹², contendo B1 (Tiamina), B7 (Biotina) e B12 (Cobalamina) (Anexo II – Solução de vitaminas).

Os cultivos de *C. raciborskii*, marcados de C₁ a C₄, foram selecionados a partir de amostras previamente recuperadas das recolhas realizadas na albufeira do Alqueva (AR – Alqueva Reservoir), em setembro de 2012 e maio de 2013, no âmbito do projeto EcotoxTools (PTDC/AAC-AMB/103547/2008).

Estas culturas, bem como as restantes existentes no laboratório foram incubadas em frascos de cultivo, estéreis, de poliestireno, com tampa ventilada (Sarstedt Ref. 83.1810.002), contendo 10 mL de meio BG11 a pH 7, no fitoclima a uma temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz por dia e intensidade média de 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. A luz para esta incubação foi obtida em iguais proporções a partir de lâmpadas simuladoras da luz do dia (“cool white” e “cool daylight”).

Nas repicagens seguintes, após verificação por observação microscópica do crescimento das espécies alvo, duplicou-se o volume de cultivo utilizando frascos de maior volume (Sarstedt Ref. 83.1811.002). As culturas foram renovadas a cada duas semanas por repartição em novos frascos e adição de meio de cultura fresco. Este procedimento permitiu a manutenção das culturas em crescimento vegetativo ativo.

3.5.3 Observação microscópica e seleção dos isolados a cultivar

Para a seleção das culturas a serem utilizadas durante este trabalho, aliquotou-se cerca de 1 mL de cada amostra e de cada cultura, para tubos tipo *Eppendorf* de 2 mL, para observação em microscopia de contraste de fase (Leitz, Laborlux K, condensador ACHROPLAN) de modo a eliminar as culturas que entretanto se revelaram dominadas por outras microalgas.

3.5.4 Ensaios de seleção variando a radiação

Este ensaio foi realizado com o objetivo de levar à inibição por radiação ultra violeta (UV) de outra microbiota acompanhante, em particular de espécies de *Synechococcus*, particularmente sensíveis aos UVs ¹¹³.

Numa placa de 24 poços, adicionou-se 2 mL de meio BG11 com adição de vitaminas e 200 µL de cultura (um tufo), realizou-se a lavagem e passou-se para o poço seguinte (Figura 3.5.4.1). Após se percorrer os poços todos, expôs-se a placa, durante 30 minutos, a luz UV a 365 nm.

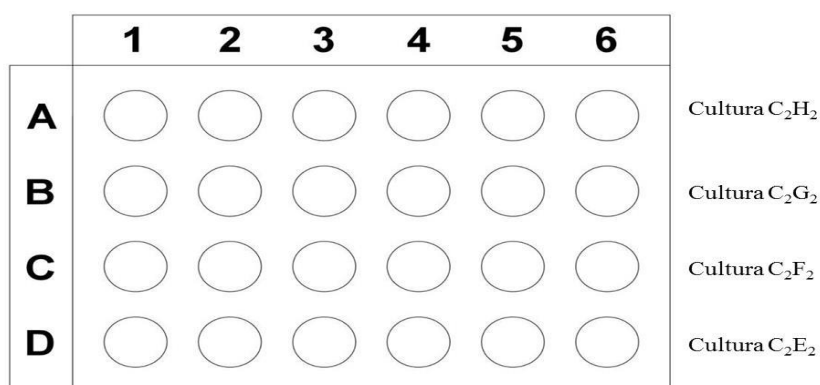


Figura 3.5.4. 1 - Esquema da placa de 24 poços utilizada exposta, durante 30 minutos, a radiação UV a 365 nm, durante a realização dos ensaios de seleção por radiação.

3.5.5 Ensaios de seleção variando a temperatura

Com a realização deste ensaio pretendeu-se verificar diferenças no crescimento de espécies de cianobactérias filamentosas e, assim, selecionar as estirpes de interesse.

Para tal replicaram-se as culturas (8 réplicas de cada cultura), nomeadas de A a P (ver Tabela 1), incubando-se metade a 32 ± 1 °C (réplica 1) e outra metade a 25 ± 2 °C (réplica 2), tal como representado na Tabela 1.

As culturas foram monitorizadas por microscopia de inversão (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2).

Tabela 1 – Nomenclatura utilizada nos ensaios de seleção variando a temperatura

Cultura	Réplica 1 (32 ± 1 °C)	Réplica 2 (25 ± 2 °C)
C ₁	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂
C ₂	E ₁ F ₁ G ₁ H ₁	E ₂ F ₂ G ₂ H ₂
C ₃	I ₁ J ₁ K ₁ L ₁	I ₂ J ₂ K ₂ L ₂
C ₄	M ₁ N ₁ O ₁ P ₁	M ₂ N ₂ O ₂ P ₂

3.5.6 Alterações ao meio BG11

Após análise da composição do meio BG11 originalmente descrito por Stanier *et al.*¹¹⁰, considerou-se a hipótese de, especificamente para *C. raciborskii*, este estar limitado em Azoto (N) e em Fósforo (P). Assim, realizaram-se as seguintes alterações ao meio original:

- Ao meio marcado como BG11 + P – adicionou-se 1 mL/L de uma solução de KH₂PO₄ a 0,14% (p/v);

- Ao meio marcado como BG11 + N + P – adicionou-se 1 mL/L de uma solução de KH₂PO₄ a 0,14% (p/v) e 1 mL/L de uma solução de ureia a 0,42% (p/v);

Foram realizados 4 replicados destas culturas em frascos de cultivo (Sarstedt Ref. 83.1810.002), contendo 10 mL de cada meio a pH 7. Todos os replicados foram mantidos no fitoclima a uma temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz por dia e intensidade média de 15 µmol·min⁻¹.

3.5.7 Monitorização do crescimento das culturas por espectrofotometria

Traçou-se, para as amostras de cada um dos replicados das culturas, um espectro de absorção entre os 360 nm e os 840 nm, com leituras a intervalos de 10 nm, utilizando o leitor espectrofotométrico de microplacas Biotek Synergy 4. Este espectro foi realizado a fim de detetar os picos de absorvância correspondentes aos pigmentos e selecionar os melhor adequados ao acompanhamento do crescimento semanal das culturas. Optou-se pela leitura das densidades óticas para os comprimentos de onda $\lambda = 440$ nm, $\lambda = 630$ nm, $\lambda = 680$ nm e $\lambda = 730$ nm.

Este procedimento teve também como objetivo mostrar qual dos três meios de cultura favorecia melhor o crescimento. Registrou-se como T_0 o momento a partir do qual se inicia a análise de crescimento com os meios BG11 (11B), BG11 + P (11C) e BG11 + N + P (11P). Para cada tempo de incubação as placas foram inoculadas de acordo com o esquema representado na Figura 3.5.7.1.

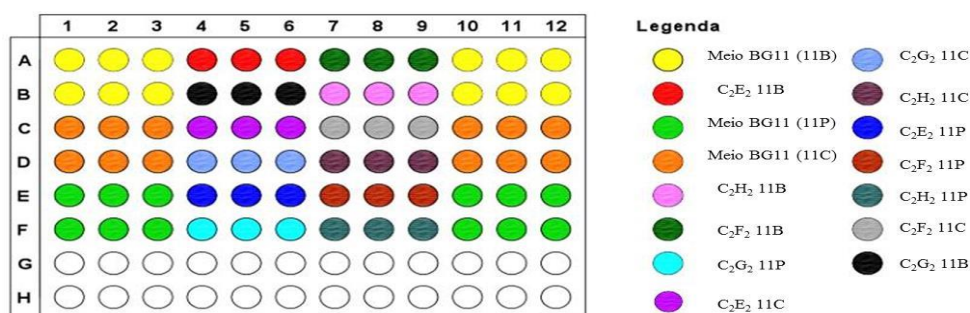


Figura 3.5.7. 1 - Esquema da placa de 96 poços utilizada para a monitorização do crescimento das culturas por espectrofotometria.

3.6 Tarefa II - Detecção dos genes *cyr* e *sxt* e sua diversidade

A fim de se detetar os genes *cyr* e *sxt* recorreu-se a amostras frescas, às culturas obtidas e a amostras preservadas em Lugol, recolhidas em diversos pontos da albufeira do Alqueva em 2011 e 2012, e para as quais havia já dados ecotoxicológicos.

3.6.1 Extração de DNA

Antes de se dar início ao protocolo de extração foi necessário realizar uma preparação das amostras de culturas, de modo a serem eliminados resíduos de meio que podiam afetar o rendimento da extração. Aliquotaram-se cerca de 2 mL de cada cultura para um tubo tipo *Eppendorf*. As culturas foram lavadas em tampão Tris-EDTA (AccuGENE™ 1X TE Buffer – Lonza, 0,01 M Tris e 0,001 M EDTA, pH 7,4) por centrifugações sucessivas a 10000 g numa centrífuga Heraeus Multifuge 3 S-R, a primeira durante 20 minutos e a segunda durante 10 minutos. A lise das células de cada *pellet* foi provocada pela sua submissão, por três vezes, a choques térmicos com as seguintes durações: 30 minutos em gelo, 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 30 minutos à temperatura ambiente. Os *pellets* foram ou macerados em azoto líquido ou tratados com lisozima (ver secções 3.6.2.1 e 3.6.2.2). Uma vez obtida a lise das células, utilizou-se o *Short Protocol* do E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), mas substituindo o *Ellution Buffer* por 50 μL de água ultra pura a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, no passo 24 do mesmo protocolo.

Para a extração de DNA a partir de amostras fixadas em Lugol introduziram-se passos de lavagem e preparação das amostras, adaptando o método descrito por Bertozzini *et al.*¹¹⁴. Assim, após homogeneização, 50 mL das amostras fixadas foram lavados duas vezes com solução de Ringer estéril, por centrifugação a 10000 g, durante 20 minutos, a 4 °C numa centrífuga Heraeus Multifuge 3 S-R e concentradas por centrifugação nas mesmas condições. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de TE e transferido para um tubo tipo *Eppendorf* de 2 mL, que foi submetido a nova centrifugação a 10000 g, durante 10 minutos, na centrífuga referida, e com o rotor apropriado. A lise das células foi obtida pelo processo acima descrito e o *Short Protocol* de E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), usado como acima descrito.

Quanto às amostras naturais, no sentido de evitar a degradação do DNA pelas DNases e enzimas de restrição produzidas pelo elevado número de bactérias presentes¹¹⁵, em especial se comparadas com as presentes nas culturas purificadas, foi necessário realizar-se também um pré-tratamento destas amostras. Assim, foram realizadas alterações ao protocolo inicial, com vista a reduzir o tempo decorrido entre a lise celular e o início do processo de extração, concentrando 10x as amostras, através da centrifugação a 5000 g, durante 20 minutos, de 100 mL de amostra divididos por dois tubos tipo *Falcon* de 50 mL, com recurso à centrífuga Heraeus Multifuge 3 S-R, descartando o sobrenadante. Cada *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de TE e os dois *pellet* da mesma amostra foram transferidos para um tubo tipo *Eppendorf* de 2 mL, que foram centrifugados a 8000 g, durante 20 minutos, antes de submeter o respetivo *pellet* a choques térmicos para lisar as células. Estes foram reduzidos comparativamente com o processo acima descrito para uma incubação a -20 °C de 30 minutos, logo seguida de outra de 5 minutos a 65 °C em banho termostaticado e 2 a 3 minutos a 37 °C antes de iniciar o tratamento com lisozima e passar ao *Short Protocol* de E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), com a alteração já descrita.

3.6.2 Tratamentos pré-extração de DNA

De modo a ser maximizado o rendimento das extrações de DNA, adicionaram-se passos intercalares de tratamento das amostras de culturas, após a limpeza de resíduos de meio, e das amostras naturais, com lisozima e com DNase e lisozima. Adicionou-se DNase para se eliminar o DNA da microbiota acompanhante presente na amostra, antes de se extrair o DNA cianobacteriano. A lisozima foi adicionada para degradar o peptidoglicano presente na parede celular das cianobactérias.

O tratamento com DNase e lisozima foi realizado após a eliminação de resíduos de meio que podiam afetar o rendimento da extração, e o tratamento só com lisozima seguiu-se ao procedimento dos choques térmicos para fragilização da parede celular.

3.6.2.1 Tratamento com lisozima e DNase

Incubou-se cada *pellet* com 1 μ L de DNase a 2 U/ μ L em banho, a 37 °C durante 30 minutos. A DNase foi então inativada a 65 °C, em banho, durante 15 minutos. Adicionou-se então 10 μ L de uma solução lisozima (L6876 Sigma-Aldrich) a 100 mg/mL e 90 μ L do tampão P1 (solução de ressuspensão das células) de E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), para uma incubação de 2 horas, a 37 °C, em banho. A inativação da lisozima foi feita em banho, a 65 °C durante 10 minutos, antes de dar início ao *Short Protocol* de E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), mas utilizando no passo 3 apenas 510 μ L do tampão P1, em vez dos 600 μ L mencionados. Manteve-se a modificação já descrita para o passo 24.

3.6.2.2 Tratamento com lisozima

Após o procedimento dos choques térmicos adicionou-se os 10 μ L da solução lisozima a 100 mg/mL e 90 μ L do tampão P1 (solução de ressuspensão das células) de E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), para uma incubação de 2 horas, a 37 °C, em banho, como descrito em 3.6.2.1. A inativação da lisozima e a extração de DNA prosseguiu também como descrito em 3.6.2.1.

Para o tratamento com lisozima em amostras naturais reduziu-se o tempo de incubação com lisozima para 90 minutos.

3.6.3 Detecção do DNA genómico extraído

A presença de DNA genómico foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (SeaKem® LE Agarose) numa solução tampão de Tris-Acetato EDTA 1x (5 PRIME TAE 50x, 2 M Tris-Acetato e 0,05 M EDTA, pH 8,3) com uma voltagem de 60V por um período de 5 minutos, seguida de 75V por um período de 30 minutos.

Ao gel adicionou-se 5 μ L do corante “EZ-Vision® In-Gel Solution” a uma concentração de 1:10000. Nos poços do gel foram carregados 5 μ L de DNA e 4 μ L de *Loading Buffer* 5x concentrado. O “GeneRuler™ DNA Ladder Fermentas 1 kb” foi o marcador utilizado ao longo do trabalho (Figura 3.6.3.1).

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder,
ready-to-use

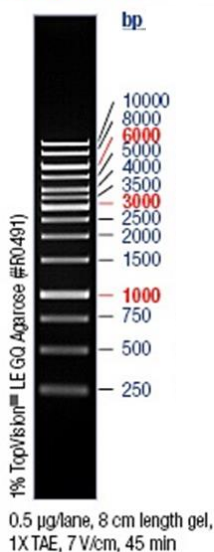


Figura 3.6.3. 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Fermentas 1 kbp

3.6.4 Seleção de *primers*

Selecionaram-se a partir da literatura fragmentos iniciadores (*primers*) para genes específicos associados à produção de CYN e STX, nomeadamente para regiões dos operões *cyr* e *sxt*, para verificação da viabilidade da sua utilização na amplificação das regiões alvo. Também se utilizaram *primers* específicos para os géneros alvo, nomeadamente *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon*, independentemente da sua toxigenicidade. Para além destes, utilizaram-se, como controle positivo das condições de PCR, *primers* específicos para o rDNA 16S de cianobactérias em geral.

Assim, foram utilizados vários pares de *primers* (Thermo Fisher Scientific), dos quais um com especificidade para uma sequência nucleotídica comum a cianobactérias, o gene do 16S rRNA (Cyan108 F e Cyan 377 R), de acordo com Urbach *et al.*¹¹⁶ e Rinta-Kanto¹¹⁷. Entre os pares de *primers* específicos para *C. raciborskii*, Cyl 2/Cyl 4¹¹⁸ amplificam uma região do gene *rpoC1* (subunidade γ da RNA polimerase dependente do DNA) e os pares PKS M4/ PKS M5¹¹⁹ e K18/ PKS M5¹²⁰ para regiões codificantes de policetídeo sintases de cilindrospermopsina. Para as péptido sintases de CYN comuns a *C. raciborskii* e a *Aphanizomenon sp.* selecionaram-se os *primers* PS M13 e PS M14¹¹⁹. A fim de se amplificar uma região do gene *rpoC1* e uma região do gene *nifH*, que codifica para a nitrogenase do género *Cylindrospermopsis*, selecionaram-se, respetivamente, os pares *rpoC1* F/R¹²¹ e Nif H F/R¹²¹. Tendo uma

região do gene *cyr J* (gene essencial na biossíntese de CYN) de cianobactérias com capacidade de sintetizarem CYN como alvo recorreu-se ao par Cynsul F/Cylnam R¹²² para a amplificar.

Para detecção de genes, necessários à produção de saxitoxinas, escolheram-se os pares de *primers* Sxt A4 F/R⁵⁹, Oct F/R⁵⁹, Sxt B F/R⁵⁹, Sxt W F/R¹²³, Sxt V F/R¹²³, apesar de ainda não ser claro que genes são essenciais à síntese de uma saxitoxina.

3.6.5 Amplificações dos fragmentos de DNA alvo

As reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com um volume final de reação de 25 µL, foram preparadas de acordo com o material disponível em laboratório. As PCRs foram realizadas num termociclador DOPPIO (VWR), de acordo com as Tabelas 2 e 3, compostas por 20 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, DMSO a 2%, 1x Mg Free PCR Buffer, 2,5 mM de MgCl₂ e 1,25 U/µL de *Go Taq G2 Flexi DNA polimerase* (Promega). A esta reação foram ainda adicionados 13,38 µL de água ultrapura estéril e 2 µL de DNA. Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se as condições de reação cumpridas para cada reação. Os produtos de PCR foram armazenados a 4 °C até se proceder à eletroforese para confirmação dos resultados. Na separação por eletroforese em gel de agarose a 1%, foram usadas as mesmas condições que para visualização de DNA genómico. Nos poços do gel foram carregados 5 µL de DNA e 2 µL de *Loading Buffer* a 1x. “GeneRuler™ DNA Ladder Fermentas 1 kb” foi o marcador utilizado ao longo do trabalho (Figura 3.6.3.1).

Foi utilizada água ultrapura como controlo negativo em todas as reações de PCR. Como controlo negativo da especificidade dos *primers* utilizaram-se estirpes de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Limnothrix* sp., conhecidas por serem produtoras de toxina, mas nenhuma das em estudo.

Tabela 2 - Condições das reações de PCR dos *primers* que têm como alvo os genes associados à produção de cilindrospermopsina

Espécie/Gênero	Primer	Gene Alvo	Protocolo PCR	Fonte
	Cyan 108 F	16S Cyano (<i>rDNA 16S</i>)	95 °C, 2 min. 95 °C, 30 s. 30x 56 °C, 1 min. 72 °C, 30 s. 72 °C, 5 min.	Urbach <i>et al.</i> , 1992
	Cyan 377 R			Urbach <i>et al.</i> , 1992 (modificado por Rinta-Kanto, 2005)
<i>C. raciborskii</i>	Cyl 2	<i>rpoC1</i>	94 °C, 2 min. 94 °C, 30 s. 35x 45 °C, 30 s. 72 °C, 30 s. 72 °C, 15 min.	Wilson <i>et al.</i> , 2000
	Cyl 4			
	PKS M4	PKS specific primers	94 °C, 4 min. 94 °C, 10 s. 30x 55 °C, 20 s. 72 °C, 1 min. 72 °C, 7 min.	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	PKS M5			
<i>C. raciborskii</i> / <i>Aphanizomenon sp.</i>	K18	PKS	94 °C, 10 min. 94 °C, 30 s. 30x 45 °C, 30 s. 72 °C, 1 min. 72 °C, 7 min.	Fergusson & Saint, 2003
	PS M13	PS specific primers/ <i>cyr B</i>	94 °C, 4 min. 94 °C, 10 s. 30x 55 °C, 20 s. 72 °C, 1 min. 72 °C, 5 min.	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	PS M14	PS specific primers/ <i>cyr A</i>		
Cianobactérias produtoras de CYN	CynsulF	<i>cyr J</i>	94 °C, 3 min. 94 °C, 10s. 30x 65 °C, 20s. 72 °C, 1 min 72 °C, 7 min.	Mihali <i>et al.</i> , 2008
	CylnamR			
<i>Cylindrospermopsis</i>	NifH F	<i>nifH</i>	95 °C, 2 min. 95 °C, 1 min. 30x 48 °C, 30 s. 72 °C, 1 min. 72 °C, 5 min.	Gugger <i>et al.</i> , 2005
	NifH R			
	rpoC1 F	<i>rpoC1</i>	95 °C, 2 min. 95 °C, 1 min. 30x 48 °C, 30 s. 72 °C, 1 min. 72 °C, 5 min.	
	rpoC1 R			

Tabela 3 – Condições das reações de PCR dos *primers* que têm como alvo os genes associados à produção de saxitoxina

Espécie/Gênero	Primer	Gene Alvo	Protocolo PCR	Fonte
<i>C. raciborskii</i>	Sxt A4 F	<i>sxt A4</i>	94 °C, 5 min. 94 °C, 30s. 35x 61 °C, 30 s. 72 °C, 30 s. 72 °C, 7 min.	Hoff-Risseti <i>et al.</i> , 2013
	Sxt A4 R			
	Oct F	<i>sxt I</i>	94 °C, 5 min. 94 °C, 30s. 35x 61 °C, 30 s. 72 °C, 90 s. 72 °C, 7 min.	
	Oct R			
	Sxt B F	<i>sxt B</i>	94 °C, 3 min. 94 °C, 30s. 35x 53 °C, 1 min. 72 °C, 1 min. 72 °C, 7 min.	
	Sxt B R			
<i>C. raciborskii</i>	Sxt X F	<i>sxt X</i>	95 °C, 2 min. 94 °C, 15 s. 30x 53 °C, 1 min. 72 °C, 1 min e 30 s. 72 °C, 7 min.	Soto-Liebe <i>et al.</i> , 2010
	Sxt X R			
	Sxt W F	<i>sxt W</i>	95 °C, 2 min. 94 °C, 15 s. 30x 53 °C, 1 min. 72 °C, 1 min e 30 s. 72 °C, 7 min.	
	Sxt W R			
	Sxt V F	<i>sxt V</i>	95 °C, 2 min. 94 °C, 15 s. 30x 53 °C, 1 min. 72 °C, 1 min e 30 s. 72 °C, 7 min.	
	Sxt V R			

3.7 Tarefa III - Rastreo da toxicidade

Previamente à realização dos testes ecotoxicológicos acima descritos, com recurso a uma câmara de Neubauer, determinou-se a densidade das cianobactérias em cultura. Realizou-se também a indução de condições de stress nas cianobactérias em cultura, uma vez que de acordo com Kaplan *et al.*¹²⁴ e Rzymiski *et al.*³⁰, a uma temperatura de 25 °C se observa uma maior concentração intra e extracelular de CYN em culturas de *C.raciborskii* quando expostas a uma intensidade de luz superior à necessária para o seu crescimento ótimo.

Assim, replicaram-se as culturas, colocando metade das réplicas no fitoclima a uma temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz por dia e intensidade média de 64 μmol·min⁻¹ – condição de *stress*. Os restantes cultivos foram mantidos também à temperatura de 25 ± 2 °C, mas com fotoperíodo de 16 horas de luz por dia e intensidade média de 15 μmol·min⁻¹ – condição *normal*.

Em ambas as condições, as repicagens das culturas continuaram a ser realizadas com regularidade, mantendo sempre as culturas “mãe”. Em função destas repicagens obtiveram-se resultados para diferentes tempos de exposição das culturas às duas condições *stress* e *normal*.

As Tarefas II e III foram realizadas para as culturas nestas variadas condições.

3.7.1 Testes de disco-difusão em Agar

Seguindo-se o método descrito por Kirby e Bauer, em 1966, realizou-se este teste com o objetivo de se fazer um *screening* da produção de toxina nas culturas¹²⁵.

Este teste foi realizado das duas formas abaixo descritas:

A) Impregnou-se 2 discos de papel de 6 mm em 8 placas com meio Agar tipo Müller-Hinton (MH) inoculado com *Escherichia coli*. Os discos foram colocados em posições simétricas e em cada um inoculou-se 20 μL de cada cultura de cianobactérias. Em cada placa de Petri testou-se uma cultura crescida na condição ditas *normal* (marcado com N) e o respetivo replicado colocado sob condições de *stress* (marcado com L), a fim de verificar eventuais diferenças na inibição de *E.coli* (Figura 3.7.1.1).

As placas de Petri foram incubadas *overnight* na estufa a 37 °C. Cumprido o período de incubação inspecionou-se a formação de halos de inibição.

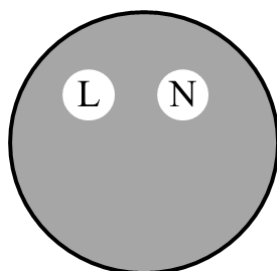


Figura 3.7.1. 1 - Teste de disco-difusão em agar realizado com as culturas.

L – cultura exposta a condições de stress; N – cultura mantida nas condições normais de crescimento.

B) Impregnou-se 4 discos de papel de 6 mm em 8 placas com meio Trypticase Soy Agar (TSA) inoculado com *Escherichia coli*. Aliquotou-se 2 mL de cada cultura de cianobactérias e centrifugou-se a 10000 g durante 20 minutos, recuperou-se os sobrenadantes, sem perturbar o *pellet*, que foi posteriormente macerado em azoto liquido, para novos tubos tipo *Eppendorf* de 2 mL. Em cada placa de Petri testou-se uma cultura crescida na condição *normal* e o respetivo replicado colocado sob condições de *stress*. Os 4 discos foram colocados em posições simétricas, 2 discos para inocular, cerca de 10 µL dos *pellets* (condições normais – N – e condições de stress – L) e 2 discos para se inocular 20 µL de cada sobrenadante (condições normais – N – e condições de stress – L) (Figura 3.7.1.2).

As placas de Petri foram incubadas *overnight* na estufa a 37 °C. Após o período de incubação foi-se inspecionar a formação de halos de inibição.

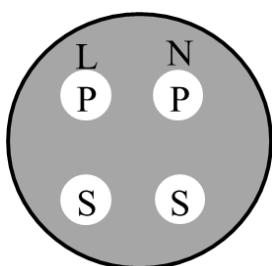


Figura 3.7.1. 2 - Teste de disco-difusão em Agar realizado com os sobrenadantes e *pellet* das culturas. L – cultura exposta a condições de stress; N – cultura mantida nas condições normais de crescimento; P – *Pellet*; S – Sobrenadante.

3.7.2 Ensaio ecotoxicológicos

Neste trabalho foram realizados ensaios ecotoxicológicos agudos recorrendo a organismos de dois níveis tróficos: decompositores (*V.fisheri*) e consumidores primários (*D.magna* e *T.platyurus*). Os bioensaios realizados em amostras frescas de Setembro de 2015 e em culturas nas quatro condições descritas anteriormente, de modo a se confirmar se os efeitos obtidos podem ou não estar correlacionados com as toxinas em estudo. Os resultados obtidos permitiram determinar a eventual toxicidade de cada uma das amostras e sempre que possível o EC₅₀ (concentração que promove um efeito letal em 50% da população exposta) foi determinado.

Os ensaios realizados foram:

3.7.2.1 Teste de Inibição de Mobilidade com *Daphnia magna*

Por se tratar de um ensaio agudo é um teste rápido que tem como objetivo determinar o efeito de substâncias contaminantes ou amostras ambientais na imobilidade ou mortalidade do crustáceo *Daphnia magna*, após 48 horas de exposição⁹⁸. Os ensaios foram realizados com juvenis, de idade inferior a 24h isolados de origem entre o 3º e o 5º nascimento, obtidos a partir de uma cultura controlada a decorrer no Laboratório de Ecotoxicologia da Escola Superior Agrária de Beja. Este ensaio foi também realizado para as culturas. Nos ensaios utilizou-se o meio ASTM como controlo negativo.

O teste segue o protocolo descrito na norma ISO (International Standards Organization) 6341 de 1996⁹⁸.

O EC₅₀ (%) foi calculado tendo em conta o número total inicial de organismos. Estes valores foram calculados a utilizando o “método de Probit” recorrendo ao *software* de análise estatística Minitab®15.

3.7.2.2 Teste de mortalidade com o crustáceo *Thamnocephalus platyurus*

Trata-se de um teste rápido que tem como objetivo determinar o efeito de substâncias contaminantes presentes em amostras de água, na mortalidade das larvas do crustáceo, após 24 horas de exposição^{85,99}.

Este teste foi realizado com recurso a THAMNOTOXKIT F™, seguindo-se as indicações descritas por MicroBioTests Inc® (Persoone, 1999)¹⁰⁰.

Os valores de EC₅₀ (%) foram calculados tendo como parâmetro de avaliação a percentagem de mortalidade dos organismos-teste. Estes valores foram calculados a

utilizando o “método de Probit” recorrendo ao *software* de análise estatística Minitab®15.

3.7.2.3 Ensaio de inibição de luz com a bactéria *Vibrio fischeri*

O ensaio baseia-se na medição da diminuição da luminescência, isto é dos níveis de expressão do operão *lux*, de uma suspensão de bactérias liofilizadas de *V. fischeri* (estirpe NRRL-B-11177), quando na presença de uma série de diluições de amostras de água (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100% (v/v)) em NaCl a 2%.

Foi determinada a inibição da emissão de luz desta bactéria quando em presença de uma amostra de água em comparação com um controlo não tóxico, NaCl a 2%, a uma temperatura de $15 \pm 0,5$ °C. Este ensaio foi também realizado para as culturas apenas quando a sua turbidez não afetava a emissão de luz por parte de *V. fischeri*.

O pH das amostras foi mantido entre 6,5-7,0. Para cada amostra a bioluminescência foi lida antes e depois do período de incubação (30 minutos). Foi ainda realizada uma medição aos 15 minutos do período de incubação.

Este ensaio foi realizado conforme o protocolo do “Dr Lange luminescent bacteria test” que segue o procedimento descrito na norma ISO 11348-2 de 1998¹⁰¹.

A percentagem EC₅₀ de cada amostra foi determinada pela avaliação da percentagem de inibição de luz. Estes valores foram calculados usando o *software* LUMISsoft 4™.

3.8 Tarefa IV – Validação da avaliação da toxicidade potencial

A fim de se integrar os resultados obtidos nas respostas às tarefas realizadas realizou-se a:

- Comparação das identificações moleculares e morfológicas;
- Avaliação convencional da toxicidade potencial com base na morfologia das espécies detetadas e sua comparação com os resultados dos ensaios de toxicidade;
- Comparação dos resultados positivos para toxicidade e a presença de genótipos *cyr+* e *sxt+*;
- Avaliação da diversidade de genótipos *cyr+* e *sxt+* detetados;
- Análise comparativa da avaliação de risco por métodos convencionais que inclui a deteção de genótipos específicos.

4. Resultados

4.1 Identificação dos géneros e contagem de cianobactérias nas amostras naturais

Após a realização de um primeiro *screening* com recurso ao microscópio ótico e ao microscópio ótico de inversão, obtiveram-se os resultados descritos na Tabela 4. Devido à baixa densidade de cianobactérias e outros organismos potencialmente tóxicos, as amostras da Barragem do Enxoé, Rio Ardila e Ribeira de Safara, dominadas por diatomáceas e organismos do filo Chlorophyta, foram descartadas.

Tabela 4 – Organismos observados após identificação microscópica

Local de amostragem	Géneros/organismos observados
Ribeira de Alcarrache	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i>
Marina da Amieira	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i> ; <i>Microcystis</i>
Monsaraz, Telheiro	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i>
Cais ancoradouro de Monsaraz	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i>
Barragem do Roxo	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i>
Mourão	<i>Aphanizomenon</i> ; <i>Cylindrospermopsis</i>
Barragem do Enxoé	Diatomáceas; Clorofíceas
Rio Ardila	Diatomáceas; Clorofíceas *
Ribeira de Safara	Clorofíceas

* Recentemente (já em 2016) durante o cultivo destas clorofíceas, no âmbito de outro trabalho, detetaram-se múltiplos tricomas de *Chrysochloris ovalisporum*, cuja avaliação já não foi possível incluir nesta dissertação.

Em função dos resultados obtidos em microscopia, realizou-se a contagem em microscopia de inversão e o posterior cálculo da densidade de cianobactérias¹⁰⁹, apenas para os locais mencionados na Tabela 5.

Tabela 5 – Densidade de cianobactérias (células/mL) em cada um dos locais de amostragem

Local de Amostragem	Densidade de cianobactérias (cel/mL)
Ribeira de Alcarrache	$3,45 \times 10^5$
Marina da Amieira	$7,43 \times 10^5$
Monsaraz, Telheiro	$1,15 \times 10^6$
Cais ancoradouro de Monsaraz	$1,15 \times 10^6$
Barragem do Roxo	$1,33 \times 10^5$
Mourão	$1,54 \times 10^6$

4.2 Tarefa I

4.2.1 Separação por citometria de fluxo ativada por fluorescência

Na purificação de isolados de *Cylindrospermopsis raciborskii* utilizou-se as culturas obtidas a partir das placas de 24 poços, contendo os tricomas de cianobactérias filamentosas, separados por citometria de fluxo ativada por fluorescência (FACS) e provenientes de amostras da albufeira de Alqueva de setembro de 2012 e maio de 2013. A observação em microscopia de contraste de fase destas culturas permitiu visualizar diversos tipos de colónias de cianobactérias, não se encontrando qualquer das amostras em estado unialgal. Verificou-se contudo a predominância de cianobactérias filamentosas. Assim, parte destas culturas acabaram por ser descartadas por se revelarem dominadas, umas por filamentos de *Limnothrix* sp. e outras por células croococóides de *Synechococcus* sp. A sucessiva purificação por repicagem das restantes permitiu obter isolados de *C. raciborskii*, como o representado na Fig. 1.2.1.1. Não foi, no entanto, possível obter isolados de *Chrysothrix ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae* em tempo útil.

4.2.2 Ensaio de seleção variando a radiação

A realização deste ensaio teve como objetivo a inibição por radiação ultra violeta (UV) da microbiota acompanhante das espécies alvo em particular de *Synechococcus* sp..

A partir da observação em microscopia de inversão (Zeiss Axio Observer LD A-PLAN 40x/0,50 Ph2) da placa de 24 poços exposta, durante 30 minutos, a luz UV, a 365 nm, selecionaram-se os melhores poços para que o seu conteúdo fosse colocado em

frascos de cultura (Sarstedt). Assim, foram transferidos para diferentes frascos de cultura os conteúdos dos poços B1 e C1 (representado a azul na Figura 4.2.2.1) e dos poços B2 e D2 (representado a vermelho na Figura 4.2.2.1).

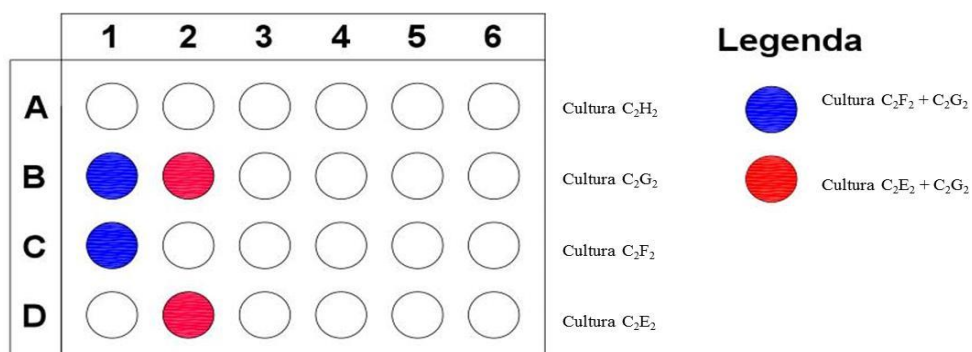


Figura 4.2.2. 1 - Esquema da placa de 24 poços utilizada exposta, durante 30 minutos, a luz UV a 365 nm, durante a realização dos ensaios de seleção por radiação.

Apesar de se ter eliminado, assim, a contaminação por *Synechococcus* sp., não foi possível garantir a viabilidade das culturas obtidas, tendo-se optado por não as utilizar em extrações de DNA. Com efeito, não teria sido possível garantir a preservação dos seus genes após uma prolongada exposição a radiação UV.

4.2.3 Ensaios de seleção variando a temperatura

Este ensaio pretendeu verificar diferenças no crescimento das espécies filamentosas e selecionar as estirpes de interesse.

A monitorização das culturas por microscopia de inversão permitiu verificar um melhor crescimento das culturas incubadas a 25 ± 2 °C (réplica 2), pelo que se passou a utilizar os isolados de *C. raciborskii* obtidos para esta réplica 2 da cultura C₂ (C₂E₂, C₂F₂, C₂G₂, C₂H₂).

4.2.4 Monitorização do crescimento das culturas com alterações ao meio BG11

Tal como referido em 3.5.6 considerou-se a hipótese de, para *C. raciborskii*, o meio BG11 estar limitado em N e em P, tendo-se por isso realizado alterações ao meio original.

Após quatro semanas de monitorização verificou-se que os compostos adicionados não favoreceram o crescimento das culturas de cianobactérias. Nas culturas às quais se adicionou BG11 + P (11C, meio ao qual se adicionou-se KH_2PO_4 a 0,14% (p/v)), e nas culturas às quais foi adicionado BG11 + N + P (11P, meio com adição de KH_2PO_4 a 0,14% (p/v) e ureia a 0,42% (p/v)), os tempos médios de duplicação respetivamente de $10,0 \pm 1,2$ dias e $29,3 \pm 4,1$ dias foram muito superiores aos obtidos para BG11, que em média foram de $6,4 \pm 0,6$ dias. Este resultado é visível nos gráficos abaixo apresentados (Figuras 4.2.4.1) que refletem a monitorização por espectrofotometria semanal do crescimento realizada para 680 nm.

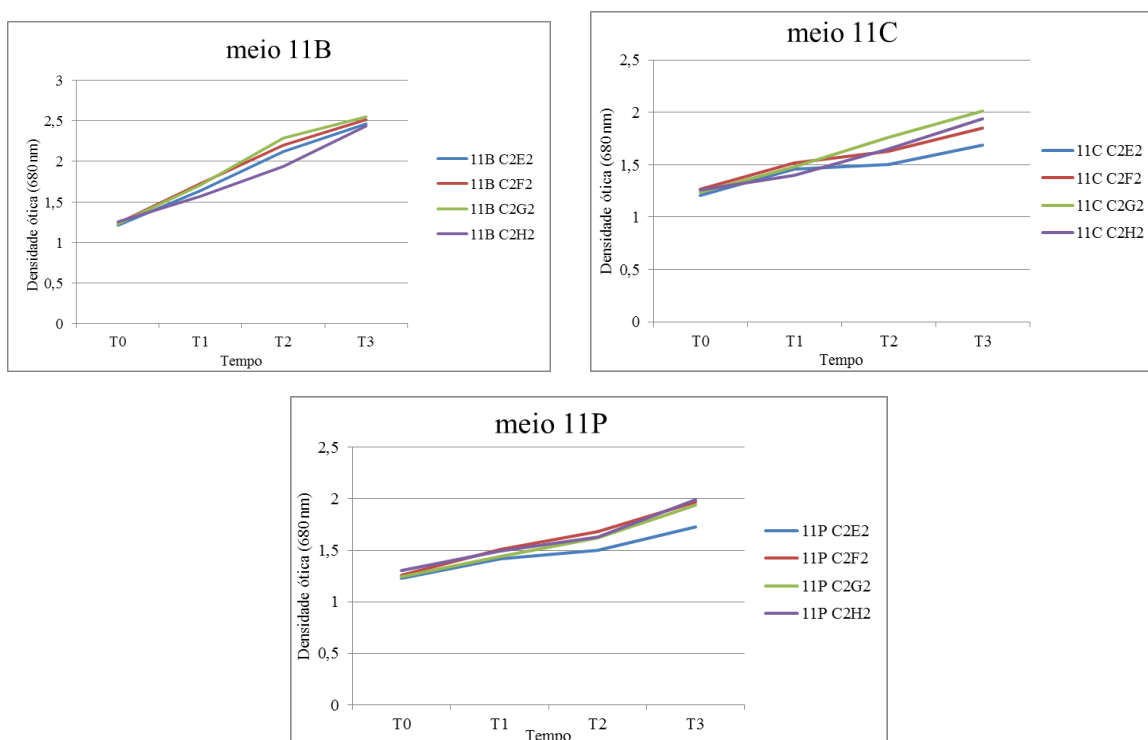


Figura 4.2.4. 1 - Monitorização do crescimento das culturas de cianobactérias realizada para os 680 nm

4.3 Tarefa II

4.3.1 Tratamentos pré-extração de DNA

A fim de se maximizar o rendimento das extrações de DNA adicionaram-se passos intercalares de tratamento das amostras de culturas, após a limpeza de resíduos de meio de cultura, com lizozima e com DNase e lizozima.

Após a extração de DNA com cada um dos pré-tratamentos, realizou-se uma PCR com os *primers* Cyan 108F e 377R, que têm como alvo regiões específicas do gene 16S de cianobactérias, uma sequência nucleotídica comum a cianobactérias, de modo a se entender assim se, efetivamente, o tratamento das amostras previamente à extração de DNA contribuiu para aumentar o rendimento deste procedimento. No gel de eletroforese representado na Figura 4.3.1.1, o grupo **A** corresponde a amostras pré-tratadas com lizozima e DNase antes da extração de DNA, o grupo **B** a amostras pré-tratadas com lizozima antes da extração de DNA e o grupo **C** a amostras que não sofreram qualquer pré-tratamento.

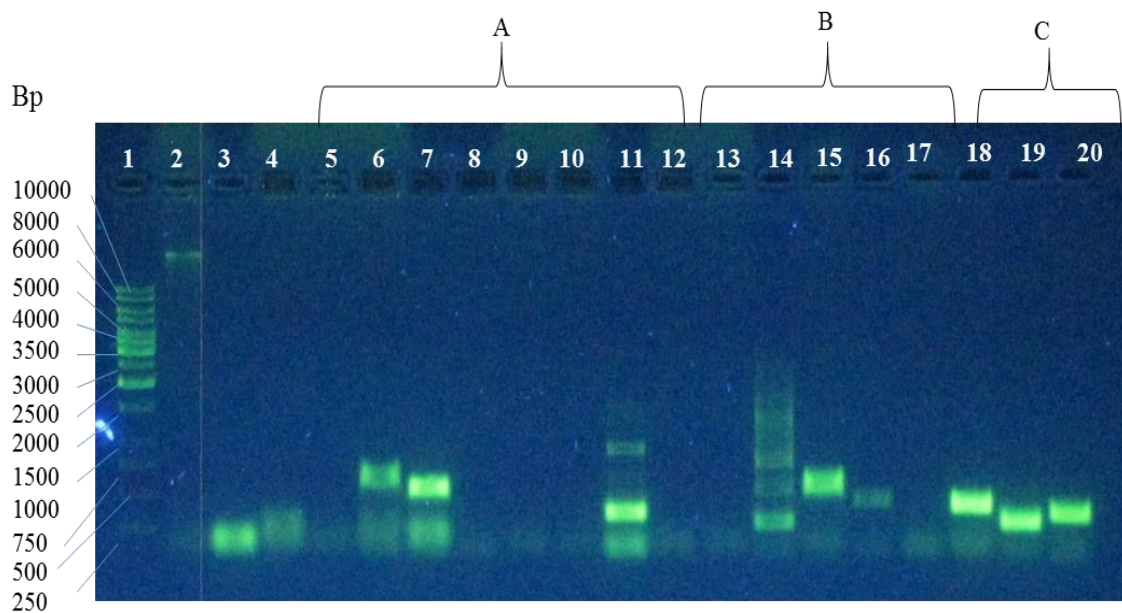


Figura 4.3.1. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Cyan 108F e 377R para extratos de DNA obtidos por uma 1ª eluição com tampão e uma 2ª eluição com água ultrapura.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – *Microcystis aeruginosa* PCC 7005; 3 – *Staphylococcus aureus* NCTC G571; 4 – água ultrapura estéril; 5 – Cultura 11C-C₂H₂ 1ª eluição; 6 – Cultura 11C-C₂H₂ 2ª eluição; 7 – Cultura 11P-C₂H₂ 1ª eluição; 8 – Cultura 11P-C₂H₂ 2ª eluição; 9 – Cultura 8P-C₂E₂ 1ª eluição; 10 – Cultura 8P-C₂E₂ 2ª eluição; 11 – Cultura 11B-C₂E₂ 1ª eluição; 12 – Cultura 11B-C₂E₂ 2ª eluição; 13 – Cultura 11B-C₂E₂ 1ª eluição; 14 – Cultura 11B-C₂E₂ 2ª eluição; 15 – Cultura 11C-C₂H₂ 1ª eluição; 16 – Cultura 11C-C₂H₂ 2ª eluição; 17 – Cultura 11P-C₂H₂ 1ª eluição; 18 – Cultura 11P-C₂H₂ 2ª eluição; 19 – Cultura C₃(2) 2ª eluição; 20 – C₂F₂ 2ª eluição. Gel corado com SYBR® GREEN adicionado ao *Loading Buffer*.

Como se pode observar, para a maioria das culturas mantidas no laboratório não se justificou qualquer pré-tratamento. No entanto, para as amostras naturais só foi possível obter DNA genómico em quantidade amplificável, recorrendo à incubação com lisozima como pré-tratamento (Figura 4.3.1.2). Esta figura ilustra a amplificação por PCR para o mesmo par de *primers* usando, como controlos negativos relativamente a DNA de cianobactérias, a água ultrapura estéril e o DNA de uma estirpe de *Staphylococcus aureus* e como controle positivo da amplificação o DNA de *Microcystis aeruginosa*. Confirmando os resultados apresentados na Tabela 5 da secção 4.1, todas as amostras colhidas em setembro de 2015 na bacia do sistema de Alqueva demonstraram ter cianobactérias.

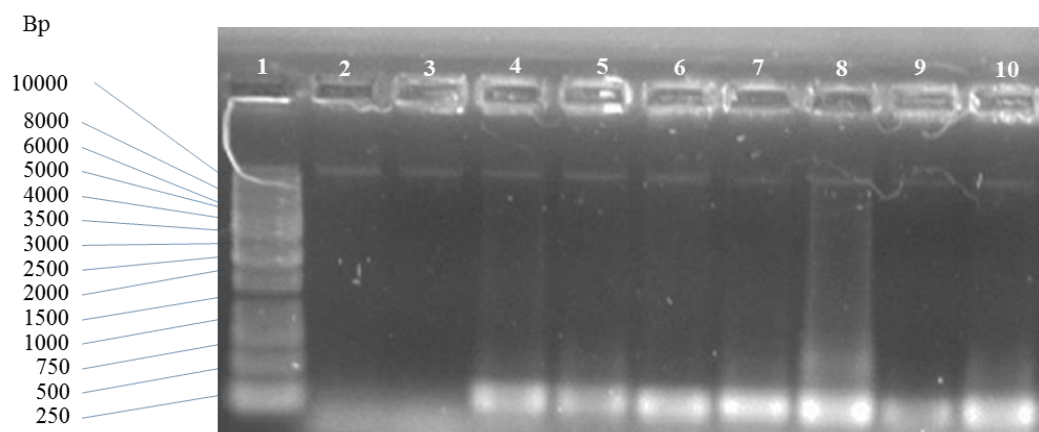


Figura 4.3.1. 2 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Cyan 108F e 377R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – *Staphylococcus aureus* NCTC G571; 4 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7005; 5 – Mourão (2015); 6 – Monsaraz, Telheiro (2015); 7 – Ribeira de Alcarrache (2015); 8 – Barragem do Roxo (2015); 9 – Marina da Amieira (2015); 10 – Cais ancoradouro de Monsaraz (2015).

Resultados positivos para o fragmento alvo de 230 bp realçados a negrito. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

4.3.2 Seleção de *primers*

Com base nos dados da literatura os *primers* selecionados para a deteção de genes específicos *cyr* e *sxt*, utilizados para posterior amplificação das regiões alvo através de análise de PCR estão indicados na Tabela 6, em que se explicita para cada um, o gene alvo e a respetiva espécie ou género de cianobactérias, a sequência de nucleotídeos, a dimensão em pares de bases do amplicão esperado e a referência ou fonte da sequência selecionada.

Tabela 6 - Sequências selecionadas de *primers* específicos para os diversos ORFs alvo

Espécie/Gênero	Gene Alvo	Primer	Sequência	Pb	Fonte
	16S Cyano (<i>rDNA 16S</i>)	108F	5' - ACGGGTGAGTAACRCGTRA - 3'	230	Urbach <i>et al.</i> , 1992
		377R	5' - CCATGGCGGAAAATTCCCC - 3'		Urbach <i>et al.</i> , 1992 (modificado por Rinta-Kanto, 2005)
<i>C. raciborskii</i>	<i>rpoC1</i>	Cyl2	5'-GGCATTCCTAGTTATATTGCCATACTA - 3'	305	Wilson <i>et al.</i> , 2000
		Cyl4	5'-GCCCGTTTTTGTCCCTTTCGTGC - 3'		
<i>C. raciborskii/Aphanizomenon sp.</i>	PKS	K18	5' - CCTCGCACATAGCCATTTGC - 3'	422	Fergusson & Saint , 2003
	<i>cyr B</i> (PS)	PS M13	5'- GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC - 3'	597	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	<i>cyr A</i> (PS)	PS M14	5'-GATGGAACATCGCTCACTGGTG-3'		
<i>C. raciborskii</i>	PKS	PKS M4	5'-GAAGCTCTGGAATCCGGTAA-3'	650	
	PKS	PKS M5	5' -AATCCTTACGGGATCCGGTGC-3'		
<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>nifH</i>	nifH F	5'- CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA - 3'	297	Gugger <i>et al.</i> , 2005
		nifH R	5'- GCATACATCGCCATCATTTCACC - 3'		
	<i>rpoC1</i>	rpoC1 F	5' - ACCATTAACTACCGCACCCCT-3'	380	
		rpoC1 R	5' -TTGTCAATTACCCGACAGACG-3'		
Cianobactérias produtoras de cilindrospermopsina	<i>cyr J</i>	cynsulf F	5'- ACTTCTCTCCTTTCCCTATC - 3'	780	Mihali <i>et al.</i> , 2008
		cynam R	5'- GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG - 3'		
<i>C. raciborskii</i>	<i>sxtA4</i>	Sxt A4 F	5' - GGACTCGGCTTGTTGCTTC - 3'	200	Hoff-Risseti <i>et al.</i> , 2013
		Sxt A4 R	5' - CCAGACAGCAGCTTCATAA - 3'		
	<i>sxtI</i>	Oct F	5' - TGCCGTTTTGTGCTTAGATG - 3'	923	
		Oct R	5' - GGACGGAAGGACTCACGATA - 3'		
	<i>sxtB</i>	SxtB F	5' - TTTGTAGGRCAGGCACTT - 3'	400	
		SxtB R	5 - ATCATCGGTATCATCGGTAG -3		
	<i>sxtA</i>	SxtA F	5' - CTCCTCTTCGGTATTGGCGG - 3'	3600	Soto-Liebe <i>et al.</i> , 2010
		SxtA R	5' - GCGGTTCCCGTTATTCTTGC - 3'		
	<i>sxtN</i>	SxtN F	5' - CTGCTAGTTTGCGGCTGGTG - 3'	1045	
		SxtN R	5' - CCCCTCTGAACGGTTACGA - 3'		
	<i>sxtX</i>	SxtX F	5' - AAAAAAGTGAAGTTAAGAGG - 3'	921	
		SxtX R	5' - TAAAACACGGGGACTACATC - 3'		
	<i>sxtW</i>	SxtW F	5' - ACTTAGGTAAAGCGCTTTG - 3'	430	
		SxtW R	5' - GCGCTACACCACCAGTATTA - 3'		
		SxtV F	5' - CCTGCTACAAC TTTAATACT - 3'		

	<i>sxtV</i>	SxtV R	5' - AGCTTAGTAAAGAACA ACT - 3'	1829	
--	-------------	--------	--------------------------------	------	--

4.3.3 Amplificações dos fragmentos de DNA alvo

Os resultados das amplificações obtidas por PCR para as culturas de cianobactérias e para as amostras naturais de albufeiras do sul de Portugal colhidas em setembro de 2015, encontram-se sumariados nas Tabelas 7 e 8, em que para cada par de *primers* se indica o número da Figura com o gel ilustrativo do resultado, e para cada tipo de DNA extraído se o resultado foi positivo ou negativo.

Tabela 7 – Resultados das amplificações para genes associados à produção de cilindrospormopsinas, em que “+” indica uma amplificação positiva e “-“ indica que não houve qualquer amplificação.

<i>Primers</i>	Cyan 108F/377R	K18/M5	M4/M5	M13/M14	NifH F/ NifH R	rpoC1 F/ rpoC1 R	Cynsulf F/ Cynlam R	Cyl 2 / Cyl 4
Frescas								
Ribeira de Alcarrache	+	-	-	-	-	-	-	+
Marina da Amieira	+	-	-	-	-	-	-	+
Monsaraz, Telheiro	+	-	-	-	+	-	-	+
Cais ancoradouro de Monsaraz	+	-	-	-	+	-	-	+
Barragem do Roxo	+	-	-	-	-	-	-	+
Mourão	+	-	-	-	-	-	-	+
Culturas								
<i>Normal</i> (carotenóides)		+	-	+	+	-	-	+
<i>Normal</i> (verdes) C2F2	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Normal</i> (verdes) C2E2	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Stress</i> (verdes)		+	-	-	-	-	-	+
<i>Stress</i> (senescência)		+	-	-	+	-	-	+
Controlos								
Água ultrapura	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC G571	-							
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7005	+							
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820		-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnothrix</i> sp.		-	+	+	+	-	-	-
Figura	4.3.1.2	4.3.3.2; 8.1; 8.2	4.3.3.3; 8.3; 8.4	8.5; 8.6; 8.7	4.3.3.4		8.8	4.3.3.1

Tabela 8 - Resultados das amplificações para genes associados à produção de saxitoxinas, em que “+” indica uma amplificação positiva e “-“ indica que não houve qualquer amplificação.

Amostras	Primers							
	Sxt A4 F/ Sxt A4 R	Oct F / Oct R	Sxt A F/ Sxt A R	Sxt B F / Sxt B R	Sxt N F/ Sxt N R	Sxt V F/ Sxt V R	Sxt W F/ Sxt W R	Sxt X F / Sxt X R
Frescas								
Ribeira de Alcarrache	-	-	-	-	-	-	-	-
Marina da Amieira	-	-	-	-	-	-	-	-
Monsaraz, Telheiro	-	+	-	-	-	-	-	-
Cais ancoradouro de Monsaraz	-	+	-	-	-	-	-	-
Barragem do Roxo	-	+	-	-	-	-	-	-
Mourão	-	-	-	+	-	-	-	-
Culturas								
<i>Normal</i> (carotenóides)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Normal</i> (verdes) C ₂ F ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Normal</i> (verdes) C ₂ E ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stress</i> (verdes)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stress</i> (senescência)	-	-	-	-	-	-	-	-
Controlos								
Água ultrapura	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnothrix</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-
Figura	8.9	4.3.3.5	8.10	4.3.3.6	8.11	8.13	8.12	8.14

Nas amostras ambientais do Algarve, devido à baixa densidade de organismos fitoplanctónicos presentes, não foi possível extrair DNA amplificável por *primers* para genes de cianobactérias.

Em todas as amostras colhidas em setembro de 2015 no Alentejo foi detetada, através da amplificação com os pares de *primers* Cyan 108 F/Cyan 377 R (Figura 4.3.1.2) e Cyl2/Cyl4 (Figura 4.3.3.1), a presença de cianobactérias e do género *Cylindrospermopsis* respetivamente. Nesta figura, relativamente ao par de *primers* Cyl 2 e Cyl 4 os amplicões de dimensão idêntica à do fragmento alvo, específico de *C. raciborskii* surgem não só para todas as amostras naturais colhidas na bacia hidrográfica do Alqueva em setembro de 2015, mas também para todas as culturas desta espécie,

sendo negativos os controles negativos constituídos por água ultrapura, por DNA de *Microcystis aeruginosa* e de *Limnothrix* sp.. Estes controles ajudaram a confirmar a especificidade deste par de *primers*.

Com recurso à Tabela 7 foi possível verificar que, no caso das amostras naturais, os resultados para os pares de *primers* PKS M4/M5, K18/M5 e M13/M14, foram todos negativos, não se tendo detetado genes de policetídeo sintases e péptido sintetases quer de *C. raciborskii*, quer de *Aphanizomenon* sp. nestas amostras. Já nos isolados das culturas nas diversas condições obtiveram-se ampliações positivas para todas as condições com o par K18/M5 (Figura 4.3.3.2) e ampliações positivas para as culturas da condição normal para o par M13/M14 (ver Anexos). Na Figura 4.3.3.2, para além do fragmento alvo de 450 bp indicador da presença do gene da policetídeo sintase de cilindrospermopsina, detetou-se uma banda de aproximadamente o dobro da dimensão para as amostras positivas. Apesar de haver amplificação de um fragmento de DNA de *Microcystis aeruginosa* (poço 8), este resultado foi considerado negativo por a dimensão ser ligeiramente superior à do fragmento alvo.

Para o par M4/M5 (Figura 4.3.3.3), cujo alvo é uma PKS associada à biossíntese de CYN em *C.raciborskii*, apenas se obteve amplificação para *C. raciborskii* de Lucefécit (setembro 2012), usado como controle positivo e para *Limnothrix* sp., usado como controlo negativo.

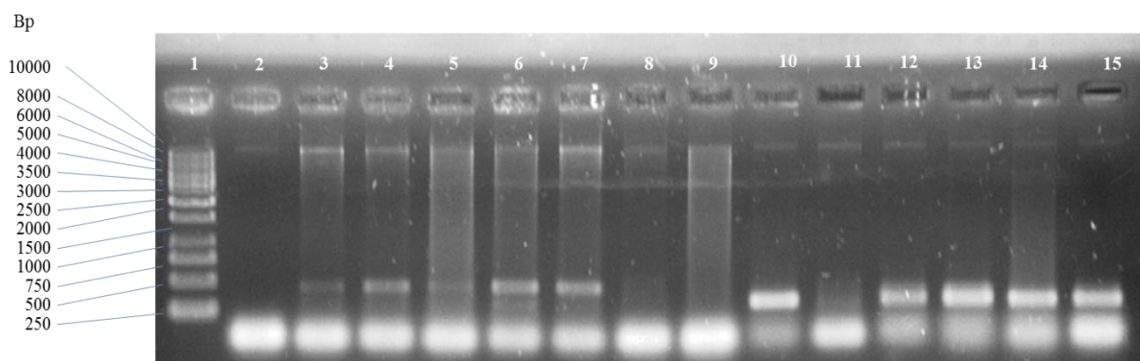


Figura 4.3.3. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Cyl 2 e Cyl 4.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - **Cultura C₂E₂**; 4 – **Cultura C₂F₂**; 5 - **Cultura em stress de luz e estando em senescência**; 6 - **Cultura em condição normal na qual houve libertação de carotenóides**; 7 - **Cultura em stress de luz mas mantendo-se verde**; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - **Ribeira de Alcarrache (2015)**; 11 – **Mourão (2015)**; 12 - **Marina da Amieira (2015)**; 13 - **Barragem do Roxo (2015)**; 14 - **Cais ancoradouro de Monsaraz (2015)**; 15 – **Monsaraz, Telheiro (2015)**.

Resultados positivos para o fragmento alvo de 305 bp realçados a negro. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

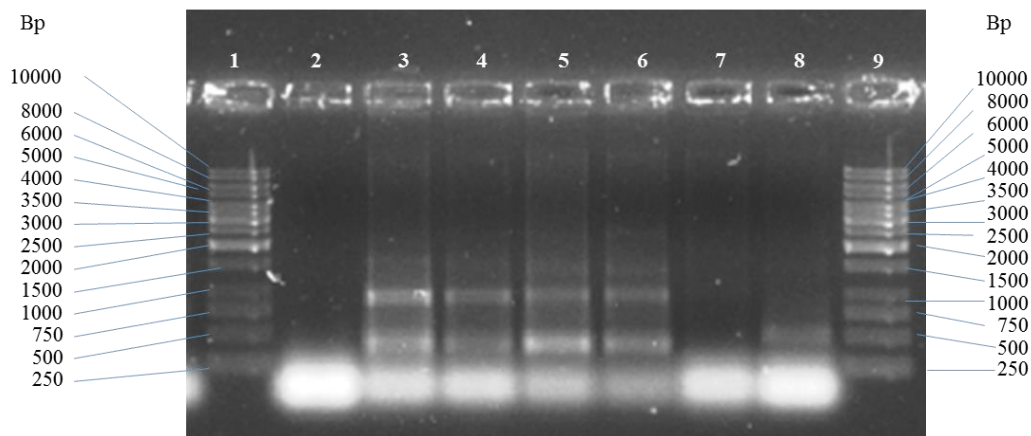


Figura 4.3.3. 2 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* K18 e M5.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – *C. raciborskii* de Lucefécit Setembro 2012; 4 - *C. raciborskii* de Mourão Setembro 2011 (fixada com Lugol); 5 – Cultura C₂E₂ 2^aeluição; 6 – Cultura C₂F₂ 2^aeluição; 7 – *Limnothrix* sp.; 8 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820.

Resultados positivos para o fragmento alvo de 450 bp realçados a negrito. Gel corado com EZ Vision® adicionado à agarose.

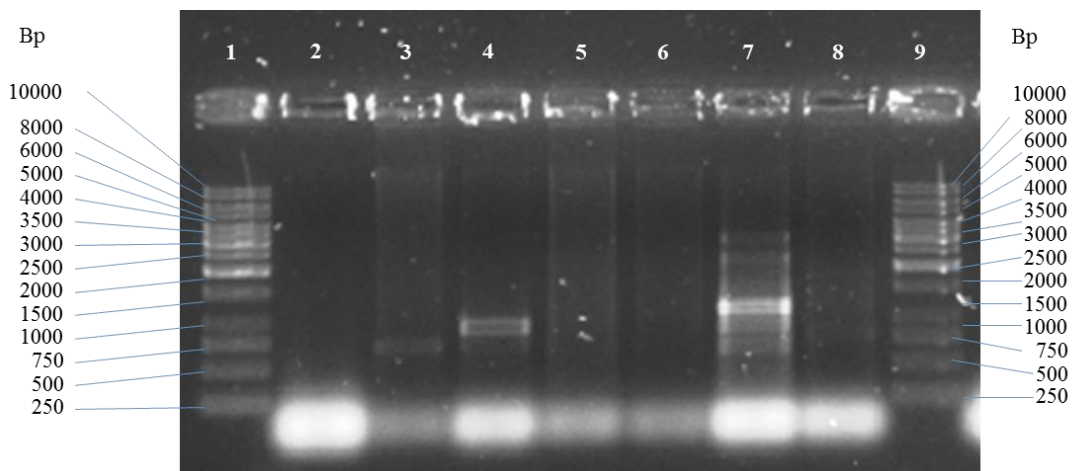


Figura 4.3.3. 3 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M4 e M5.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – *C. raciborskii* de Lucefécit Setembro 2012; 4 - *C. raciborskii* de Mourão Setembro 2011 (fixada com Lugol); 5 – Cultura C₂E₂ 2^aeluição; 6 – Cultura C₂F₂ 2^aeluição; 7 – *Limnothrix* sp.; 8 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820.

Resultados positivos para o fragmento alvo de 650 bp realçados a negrito. Gel corado com EZ Vision® adicionado à agarose.

Após amplificação com o par de *primer* Nif H F/Nif H R que tem como alvo o gene da nitrogenase no género *Cylindrospermopsis* (*nifH*) (Figura 4.3.3.4), obtiveram-se ampliações positivas para ambas as amostras de Monsaraz, Telheiro e Cais ancoradouro, para a cultura em condição *normal* na qual houve libertação de carotenóides e para a cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência.

A detecção de *rpoC1*, através do par de *primers* rpoC1 F/rpoC1 R, e de *cyr J*, amplificado pelo par Cynsulf F/Cylnam R, não deu quaisquer resultados positivos quer nas amostras naturais, quer nas amostras de culturas.

Na detecção de génotipos *sxt*, representada na Tabela 8 apenas se obteve resultados positivos para *sxt I*, amplificado pelo par Oct F/Oct R (Figura 4.3.3.5), e para *sxt B*, amplificado pelo par sxt B F/sxt B R (Figura 4.3.3.6). Nestas ampliações apenas se obteve-se resultados positivos para as amostras naturais. As restantes ampliações tendo como alvo genes associados à biossíntese de STX foram negativas.

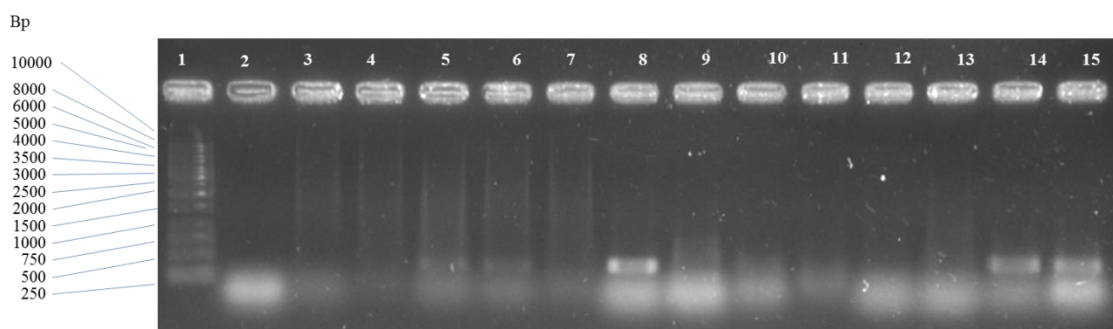


Figura 4.3.3. 4 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* NifH F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C₂E₂; 4 – Cultura C₂F₂; 5 - **Cultura C₂E₂ em stress luminoso** e estando em senescência; 6 - **Cultura em condição normal** na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura em *stress* de luz mas mantendo-se verde; 8 – ***Limnothrix* sp.**; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - **Cais ancoradouro de Monsaraz** (2015); 15 – **Monsaraz, Telheiro** (2015). Resultados positivos para o fragmento alvo de 297 bp realçados a negrito. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

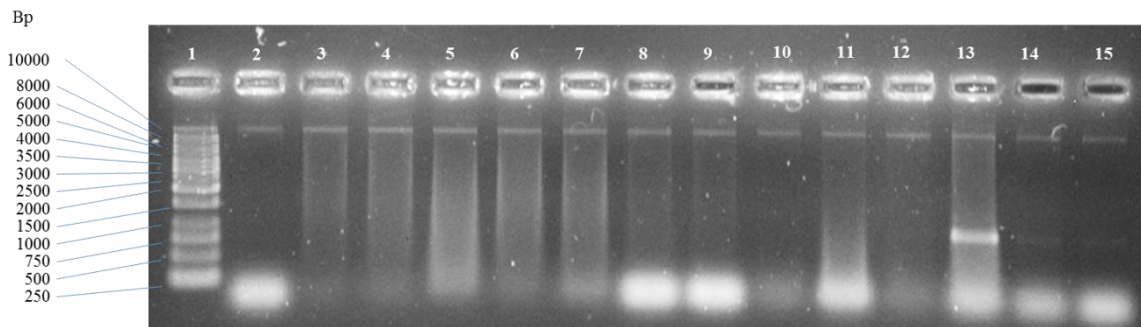


Figura 4.3.3. 5 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Oct F e R. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 - Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura em *stress* luminoso e estando em senescência; 6 - Cultura em condição *normal* na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura em *stress* de luz mas mantendo-se verde; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão; 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - **Barragem do Roxo** (2015); 14 - **Cais ancoradouro de Monsaraz** (2015); 15 – **Monsaraz, Telheiro** (2015).

Resultados positivos para o fragmento alvo de 923 bp realçados a negrito. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

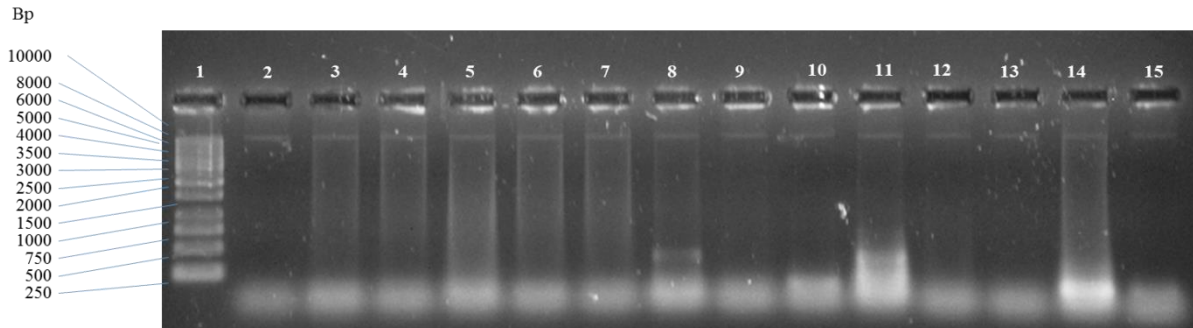


Figura 4.3.3. 6 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt B F e R. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 - Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – **Mourão** (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Resultados eventualmente positivos para o fragmento alvo de 400 bp realçados a negrito. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

Com recurso às Tabelas 7 e 8 foi possível verificar-se que houve uma maior deteção de génotipos *cyr* para os isolados de culturas de cianobactérias e uma maior deteção de génotipos *sxt* nas amostras naturais.

Como referido anteriormente, a confirmação dos resultados após a realização das amplificações por PCR foi realizada por meio de géis de eletroforese. As Figuras 4.3.3.1 a 4.3.3.6 são exemplos de alguns dos géis de eletroforese com os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8, os restantes encontram-se nos Anexos III e IV. Estas figuras mostram amplificações positivas para genes associados à síntese de cilindrospermopsina em amostras de culturas (Figuras 4.3.3.2 a 4.3.3.4) e saxitoxina para amostras frescas e de culturas (Figuras 4.3.3.5 e 4.3.3.6).

4.4 Tarefa III

4.4.1 Indução de condições de *stress* nas cianobactérias em cultura

Dentro de cada condição (**stress** e **normal**) variou-se o tempo de exposição das culturas à luz, obtendo-se, assim quatro condições diferentes, representadas na Figura 4.4.1.1:

- A - Cultura em stress de luz mas mantendo-se verde (cor dita “saudável” para este tipo de cultura) – média de 47 dias expostas à luz;
- B - Cultura C₂E₂ em stress luminoso e estando em senescência – média de 128 dias expostas à luz;
- C - Culturas, com cor verde, em condição normal (culturas C₂E₂ e C₂F₂) – média de 39 dias expostas à luz;
- D - Cultura em condição normal na qual houve libertação de carotenóides (tendo uma cor alaranjada) – média de 88 dias expostas à luz.

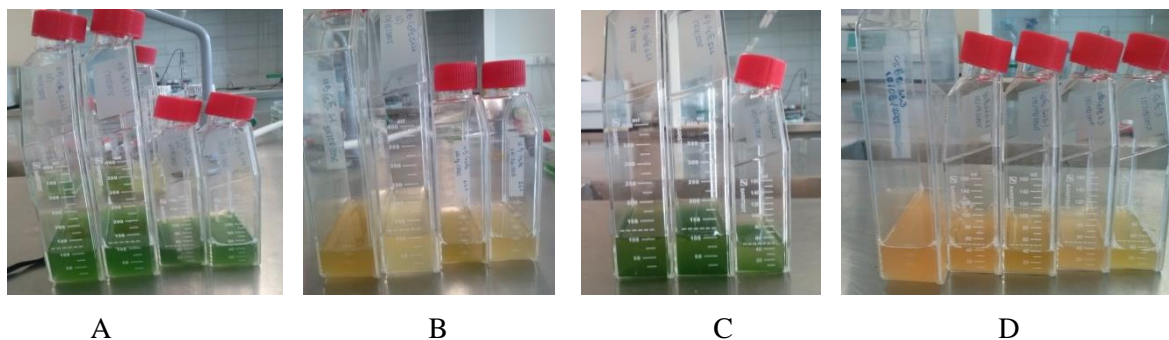


Figura 4.4.1. 1 - Condições das culturas de cianobactérias.

A e B correspondem às culturas expostas a stress luminoso (*stress*);

C e D correspondem às culturas mantidas em condições normais de crescimento (*normal*).

Na Tabela 9 estão indicadas as densidades das culturas, mantidas nas quatro condições anteriormente descritas, determinadas com recurso a uma câmara de Neubauer.

Tabela 9 - Densidade de cianobactérias (células/mL) em cultura em cada uma das condições de crescimento.

Condições de crescimento	Densidade (cel/mL)
<i>Normal</i> (carotenóides)	$2,14 \times 10^7$
<i>Normal</i> (verdes)	$1,07 \times 10^8$
<i>Stress</i> (verdes)	$8,20 \times 10^7$
<i>Stress</i> (senescência)	$4,26 \times 10^7$

4.4.2 Testes de disco-difusão em agar

Após a realização dos testes de disco-difusão em agar, com o objetivo de se fazer um eventual rastreio da toxicidade das culturas, os resultados obtidos mostram que *Escherichia coli* não foi inibida pelas culturas, visto que não ocorreu a formação de halos de inibição, independentemente de se inocular diretamente a cultura (A) ou de se inocular o *pellet* e respetivo sobrenadante, após centrifugação de 2 mL de cultura (B) (Figura 4.4.2.1).

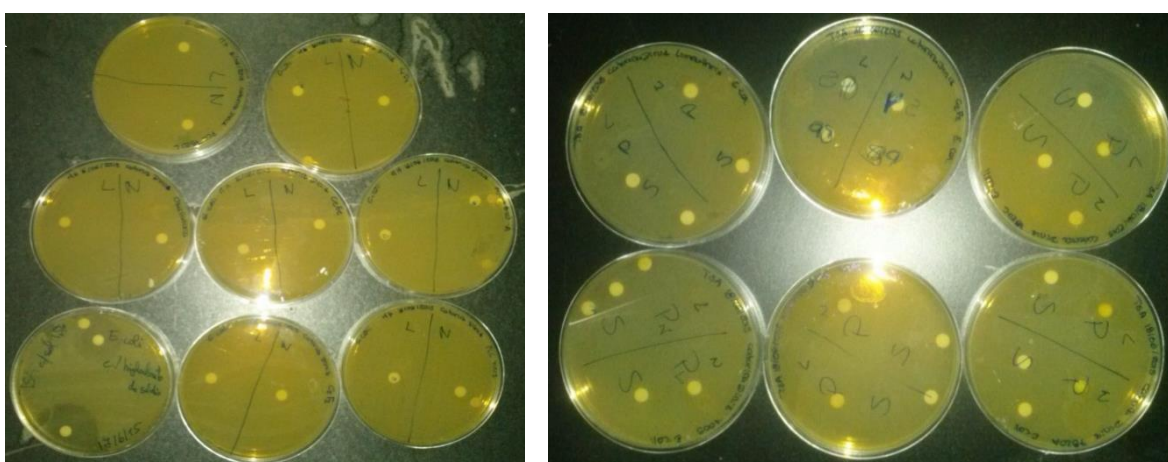


Figura 4.4.2. 1 - Teste de disco-difusão em agar:

A) Realizado com as culturas;

B) Realizado com os sobrenadantes e *pellet* das culturas.

L – Cultura exposta a condições de stress; N – Cultura mantida nas condições normais de crescimento; P – *Pellet*; S – Sobrenadante.

4.4.3 Ensaio ecotoxicológicos

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios ecotoxicológicos para as amostras de águas e para as culturas, encontram-se descritos nas Tabelas 10 e 11, respetivamente.

Pela análise dos resultados descritos na Tabela 10, é possível verificar que quer na exposição aguda de 48 horas com *D. magna* quer na de 24 horas com *T. platyurus* não foi observada qualquer toxicidade nas seis amostras de água em estudo. Já através do rastreio por *V. fischeri* as amostras da Ribeira de Alcarrache e de Monsaraz, Telheiro revelaram alguma toxicidade.

Tabela 10 - Toxicidade aguda das amostras de água em estudo nas espécies *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*.

Local de amostragem	(%) EC ₅₀			
	<i>Vibrio fischeri</i> 15 min	<i>Vibrio fischeri</i> 30 min	<i>Daphnia magna</i>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
Ribeira de Alcarrache	64,10 (±0,12)	47,82 (±0,06)	Não tóxica	1,30 (±0,18)
Marina da Amieira	Não tóxica		Não tóxica	Não tóxica
Monsaraz, Telheiro	82,18 (±0,10)	66,64 (±0,12)	Não tóxica	Não tóxica
Cais ancoradouro de Monsaraz	Não tóxica		Não tóxica	Não tóxica
Barragem do Roxo	Não tóxica		Não tóxica	3,14 (±2,03)
Mourão	Não tóxica		Não tóxica	Não tóxica

Com recurso à Tabela 11, é possível verificar que tanto nas exposições agudas de 48 horas com *D. magna* como no rastreio por *V. fischeri*, foi detetada toxicidade nas amostras de culturas de cianobactérias testadas.

Tabela 11 - Toxicidade aguda das culturas de cianobactérias em estudo nas espécies *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna*

Condição de crescimento	(%) EC ₅₀		
	<i>Vibrio fischeri</i> 15 min	<i>Vibrio fischeri</i> 30 min	<i>Daphnia magna</i>
<i>Normal</i> (carotenóides)	93,53 (±0,02)	47,84 (±0,01)	35,59 (±3,70)
<i>Normal</i> (verdes)	Não determinado		45,67 (±3,33)
<i>Stress</i> (verdes)			78,54 (±6,60)
<i>Stress</i> (senescência)	84,21 (±0,09)	57,89 (±0,01)	93,40 (±3,04)

Em uma das amostras crescida nas condições normais (*normal*) e em uma das expostas a stress luminoso (*stress*), não foi possível realizar o ensaio de inibição de luz com a bactéria *V. fischeri* por ambas terem como fator comum: a cor. Tendo este ensaio por base a medição da diminuição da luminescência desta bactéria, a cor escura das culturas funcionaria como factor de interferência.

5. Discussão

5.1 Tarefa I

O isolamento e purificação de estirpes produtoras de CYN e STX revelou-se um processo moroso e difícil, não tendo sido possível obter em tempo útil culturas unialgais de *Chrysochlorium ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae*, apesar de transientemente estas espécies terem surgido nalgumas culturas.

Já relativamente a *Cylindrospermopsis raciborskii* a multiplicidade de procedimentos utilizados permitiu a obtenção e manutenção de culturas dominadas por esta espécie. O elevado tempo de duplicação destas culturas em BG11 ($6,4 \pm 0,6$ dias) justificou perfeitamente a morosidade de todo o processo, que contribuiu para o atraso na finalização deste trabalho. Relativamente às técnicas utilizadas na purificação dos isolados desta espécie concluiu-se que a FACS, ao seleccionar apenas células com ficocianina e clorofila *a*, foi sobretudo útil para eliminar a maior parte da bacteriobiota acompanhante, não sendo no entanto eficaz para a separação taxonómica de cianobactérias filamentosas. Tricomas de idêntica dimensão pertencentes a espécies e até a ordens diferentes, foram seleccionados simultaneamente e a mucosidade associada ao crescimento de algumas destas filamentosas permitiu também nalguns casos a recolha simultânea de células de picocianobactérias como as de *Synechococcus* sp.. Estas foram de algum modo muitas vezes favorecidas nas condições correntes de cultivo utilizadas no fitoclima do Laboratório de Ecologia Molecular e Microbiana, redundando na perda de culturas. Assim, com a seleção por FACS apenas se conseguiu dar início a culturas quer de *Limnothrix* sp., quer de *C. raciborskii*, culturas que foram sendo purificadas por repicagens sucessivas e submissão a elevadas temperaturas para eliminação de microbiota acompanhante. Apesar de os próprios tempos de duplicação das culturas indicarem estarem estas limitadas por algum factor, a suplementação do meio BG11 com fósforo ou com fósforo e ureia diminui visivelmente as taxas de crescimento, chegando a quadruplicar os tempos de duplicação. Assim, nas condições de cultivo descritas o meio BG11, descrito por Ripka *et al.*¹¹¹, foi o que mais favoreceu o crescimento de *C. raciborskii* (Figura 4.2.4.1).

Os valores médios de densidade de cianobactérias, nestas massas de água, (Tabela 5) rondaram as $8,42 \times 10^5$ células/mL. Como referido na introdução, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization), só valores abaixo das 20.000 células de cianobactérias/mL em águas recreativas correspondem a

um risco baixo de efeitos adversos a curto prazo, tais como irritações dérmicas ou doenças gastrointestinais, em adultos saudáveis ⁷⁵. Para valores de células cianobacterianas superiores a 100.000 células/mL, existe risco de efeitos adversos a curto prazo como intoxicações agudas, além da possibilidade de se observarem efeitos adversos a longo prazo ⁷⁵ sobretudo em locais onde ocorra formação de escumas e haja risco de contacto direto, inalação ou ingestão da água ⁷⁵. Assim, as florescências detetadas em setembro de 2015 deverão ser motivo de elevada preocupação para as entidades gestoras da água.

5.2 Tarefa II

Apesar da análise da Figura 4.3.1.1 parecer indicar que pré-tratamentos seriam desnecessários, verificou-se para as amostras naturais que a introdução de passos de pré-tratamento aumentou o rendimento da extração de DNA. Observou-se também a reduzida diferença entre os rendimentos de extração correspondentes às amostras pré-tratadas com lisozima e DNase e as amostras pré-tratadas somente com lisozima, pelo que se passou a utilizar este último tratamento.

Quanto à deteção de genótipos de estirpes toxigénicas por *primers* específicos, os resultados sugerem a necessidade do aprofundamento dos estudos sobre os genes indispensáveis à produção das toxinas CYN e STX, de modo a desenhar *primers* de maior especificidade. Obtiveram-se amplificações com DNA de *Microcystis aeruginosa* e *Limnothrix* sp. para policetídeo sintases envolvidas na síntese de CYN e para genes associados à biossíntese de STX (Figuras 4.3.3.2 a 4.3.3.5). Este resultado não era esperado, visto que estas estirpes apesar de conhecidas por também sintetizarem cianotoxinas, estas diferem a nível de classe, estrutura química e via de biossíntese.

Ainda no âmbito da deteção de genótipos *cyr* em culturas de cianobactérias (Tabelas 7 e 8), obteve-se repetidamente, por via de eletroforese, mais do que uma banda por amostra (Figura 4.3.3.2). Assim, é possível que a região amplificada possa corresponder a um gene homólogo presente em outra estirpe ou espécie. O facto de as análises supramencionadas se terem realizado em culturas não puras, possíveis polimorfismos do *cluster* ou a inespecificidade do *primer* utilizado podem ter contribuído para estes resultados. De facto, os *primers* utilizados foram desenhados e considerados específicos para estirpes da Austrália e Brasil, locais onde estas cianobactérias são encontradas com maior frequência e estudadas há mais tempo ^{120, 126,}

Por outro lado, a programação incorreta dos ciclos de PCR, bem como a contaminação ou uso de concentrações erróneas de reagentes ^{127, 128} foram excluídos como indutores de resultados inesperados. Para todas as amplificações foi cumprido o programa de PCR recomendado pelo autor correspondente, além de ter sido introduzido um controlo negativo contendo água ultrapura estéril que não revelou qualquer contaminação.

Foram também usadas as quantidades de reagentes descritas como recomendadas para a polimerase em uso. A degradação do DNA ^{127, 128} em uso foi também descartada, por este resultado surgir intermitentemente em amplificações e amostras díspares.

Em suma, quaisquer fatores exteriores que potencialmente pudessem influenciar os resultados descritos nas (Figuras 4.3.3.2 a 4.3.3.5), foram descartados. Assim, assumiu-se que a metodologia aqui descrita foi correta e que os resultados que dela advieram foram credíveis (Tabelas 7 e 8).

Assinale-se, no entanto, as implicações para trabalhos futuros do facto de se ter obtido resultados diferentes, em termos de amplificações dos genes do operão *cyr*, para culturas em diversos estados fisiológicos, por submissão a condições de *stress* luminoso. Tratando-se de replicados das mesmas culturas, não faria à partida qualquer sentido que os genes de umas fossem diferentes dos das outras, sobretudo porque dado os elevados tempos de duplicação não terá sido possível a seleção de estirpes geneticamente diferenciadas. Põe-se, portanto a hipótese, de haver rearranjos das sequências genéticas do operão *cyr*, descrito como flanqueado por transposões ¹²⁹ que inviabilizem a deteção das sequências alvo.

Em nenhuma cultura ou amostra se detetou o gene *cyr J*, alvo do par de *primers* Cynsulf F e Cylnam R (Figura 8.8 Anexo III), gene dado como indispensável à produção de CYN, por só ter sido encontrado em estirpes produtoras. Este resultado inviabilizaria à partida que qualquer toxicidade observada nos ensaios ecotoxicológicos pudesse ser associado a CYN. No entanto, a presença de genes para diversas sintetases, sugere alguma capacidade toxigénica, sobretudo se considerarmos que as estirpes de *C. raciborskii* até agora isoladas em Portugal não eram produtoras de CYN, mas de toxinas desconhecidas ⁹⁷.

Quanto à deteção de genótipos *sxt* apenas se detetaram sequências homólogas para o gene *sxt I*, nas amostras da albufeira do Roxo e nas de Alqueva ao nível de Monsaraz e ao nível de Mourão detetou-se o gene *sxt B*. Estes resultados concomitantes

com a presença de toxicidade ao nível quer de Monsaraz (Telheiro), quer na albufeira do Roxo, não permitem ainda a extrapolação quanto à origem da toxicidade, dado o fraco desenvolvimento dos estudos genéticos sobre o operão *sxt* em espécies de cianobactérias.

Saliente-se, no entanto, que até agora o gene *sxt I* só foi detetado em isolados produtores de saxitoxinas.

Note-se ainda que o gene *sxt B* foi também observado na cultura de *Limnothrix* sp. (Oscillatoriales), um género a que se atribui a produção de uma toxina desconhecida, ainda não isolada, designada por limnotrixina.

5.3 Tarefa III

O facto de a realização de testes de disco-difusão em meio Müller-Hinton (MH) não ter revelado formação de halos de inibição em quaisquer culturas era esperado, dada a fraca difusão da toxina no meio e a seletividade da própria *Escherichia coli* que, certamente contribuíram para o mesmo tipo de resultado final em testes anteriores em que se usou microcistinas. O objetivo deste ensaio foi apenas de o de tentar obter um critério para seleção das amostras e culturas a submeter a testes ecotoxicológicos.

A exposição da bactéria *V. fischeri* às culturas em diferentes condições de cianobactérias em estudo (Tabela 11), permitiu concluir que as culturas em condições *normal* de crescimento, mas nas quais ocorreu a libertação de carotenóides, têm um EC_{50} menor do que as culturas senescentes mantidas em *stress* luminoso.

Na condição *normal* foram necessárias 2×10^7 células/mL de cianobactérias ao fim de 15 minutos de exposição, e $1,2 \times 10^7$ células/mL, ao fim de 30 minutos do ensaio, das $2,14 \times 10^7$ células/mL da sua concentração inicial, para promover um efeito letal em pelo menos 50% dos organismos expostos. Já na condição *stress* foram necessárias $3,59 \times 10^7$ células/mL, após 15 minutos, e $2,47 \times 10^7$ células/mL, após 30 minutos de exposição, das $4,26 \times 10^7$ células/mL da sua concentração inicial de cianobactérias, para se obter o mesmo resultado.

Depois da exposição aguda de *D. magna* durante 48 horas a culturas de cianobactérias (Tabela 11), verificou-se uma concordância com a situação anteriormente descrita. As culturas da condição *normal* necessitaram de $7,61 \times 10^6$ células/mL (*normal* (carotenóides)) e $4,89 \times 10^7$ células/mL (*normal* (verdes)), o que corresponde a, aproximadamente, 35,6% e 45,7%, respetivamente, da sua concentração inicial. Já no caso das culturas da condição *stress*, foram necessários $3,98 \times 10^7$ células/mL (*stress*

(senescência)) e $6,44 \times 10^7$ células/mL (*stress* (verdes)), isto é, cerca de 93,4% e 78,5% das suas concentrações iniciais (Tabela 9), respetivamente.

De acordo com Neilan *et al.*¹³⁰, a disponibilidade de nutrientes e a intensidade luminosa são dos principais fatores envolvidos na síntese e libertação de toxinas por parte das cianobactérias. Neste caso, o único factor de stress foi um aumento significativo da luminosidade, não estando as culturas limitadas em nutrientes nem em termos de área disponível (uma vez que eram realizadas repicagens regulares), e a temperatura se manteve constante. Estes resultados não corroboram pois a implicação do stress luminoso na produção de toxinas.

No que respeita aos resultados obtidos através da realização de ensaios de toxicidade em amostras naturais (Tabela 10), verificou-se que para as amostras da Marina da Amieira, Cais ancoradouro da Barragem do Alqueva e Mourão não foi detetada qualquer toxicidade. No caso das amostras da Ribeira de Alcarrache, Telheiro, Monsaraz e Barragem do Roxo foi detetada alguma toxicidade. Após a exposição de *V.fischeri*, obtiveram-se EC₅₀ de 64,10% (15 minutos) e 47,82% (30 minutos) na amostra de Alcarrache, e respetivamente 82,18% e 66,64%, aos 15 e 30 minutos de exposição da bactéria, para a amostra do Telheiro de Monsaraz. Já a exposição de *T. platyurus* às amostras naturais revelou EC₅₀ de 1,30% para a Ribeira de Alcarrache e 3,14% para a amostra da Barragem do Roxo. Estes resultados podem ser justificados devido a: (i) diferenças de sensibilidade dos três bioindicadores utilizados em relação aos contaminantes/poluentes presentes nas várias amostras; e/ou (ii) ausência de produção de toxina por parte das cianobactérias detetadas na amostra. De facto, *T. platyurus* tem sido considerado melhor bioindicador para deteção de cianotoxinas, sendo particularmente suscetível a estas¹³¹.

5.4 Tarefa IV

A realização dos ensaios ecotoxicológicos, permitiu pois confirmar a presença de toxicidade sendo necessário associar estes resultados aos dos genótipos detetados para sugerir as cianobactérias como origem desta toxicidade.

No entanto, com os resultados obtidos não é possível garantir que a toxicidade detetada se deva à presença de cianotoxinas ou de outros fatores químicos de stress como inseticidas ou herbicidas anteriormente detetados na albufeira de Alqueva^{132, 133}. Resultados de avaliação ecotoxicológica de pesticidas realizados por Palma, P. *et al.*⁹⁹ e Palma, P.⁸⁵, mostraram que o crustáceo *D. magna* apresenta sensibilidade para este

inseticidas. Tal facto suporta a hipótese de que a toxicidade detetada se possa dever à ação das cianotoxinas em estudo.

Para uma análise mais eficaz, seria necessário recorrer à análise das toxinas presentes por LC- MS/MS ou à análise transcriptómica para se determinar os níveis de transcritos associados à biossíntese destas toxinas. Efetivamente as análises em LC-MS/MS chegaram a estar previstas, com o apoio da Prof^a Doutora Conceição Mateus, mas tiveram de ser adiadas, devido a sucessivos problemas com o equipamento. Estas análises teriam permitido associar os génotipos detetados à presença de toxina e esta à toxicidade detetada.

Na ausência de qualquer análise genotípica, as avaliações do risco toxicológico associado a CyanoHABs têm vindo a assumir, como sendo potencialmente tóxicas, todas as células de espécies em que já foi detetada toxicidade em qualquer parte do mundo ¹³⁴. Este tipo de abordagem, ainda que precaucionista, não permite estabelecer relações fiáveis com os níveis de toxina e de ecotoxicidade detetados ¹³⁵. Não tendo sido possível com este trabalho apresentar um método definitivo que permitisse superar esta situação, fez-se, no entanto, uma primeira abordagem, à diferenciação molecular da presença de estirpes que com verdadeira toxicidade potencial por serem portadoras do respetivo génotipo. Pretende-se em abordagens posteriores investigar métodos de deteção rápida destes genes e da sua expressão, dispensando assim as morosas e dispendiosas análises de múltiplas toxinas e eventualmente quantificar apenas a que pode efetivamente estar presente.

Para além de ser simples, rápida e economicamente viável, a deteção de cianobactérias tóxicas com recurso a métodos moleculares poderá vir a ser extremamente sensível, específica e compatível com análises de alto rendimento. O recurso a este tipo de testes já promoveu avanços significativos na área da qualidade da água ⁶⁰.

6. Conclusão

Após o cumprimento dos objetivos estabelecidos e análise dos resultados obtidos foi possível encontrar resposta para as questões colocadas na secção 2.

Assim, verificou-se que os isolados de cianobactérias filamentosas das albufeiras do sul de Portugal mantidos em cultura são portadores de genes *cyr* (*C. raciborskii*) e/ou

sxt (*Limnothrix sp.*). Nas amostras frescas também foi possível verificar-se a presença destes genótipos nas albufeiras do Baixo Alentejo.

Uma análise retrospectiva da toxicidade potencial de amostras, fixadas com solução de Lugol, só teria sido possível para amostras armazenadas por um período inferior a 12 meses¹⁰⁹, tempo após o qual este fixante se degrada e a extração de DNA viável para análises moleculares deixa de ser possível. Este facto inviabilizou a integração neste trabalho dos dados ecotoxicológicos obtidos em 2011 e 2012.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que a associação de ferramentas ecotoxicológicas à deteção de genótipos específicos de produção de cianotoxinas, na análise de amostras naturais, só será uma verdadeira mais valia após estudos genéticos mais aprofundados que permitam o desenho de *primers* mais adequados. Este tipo de *screening* das amostras naturais será sem dúvida mais eficiente, na medida em que os resultados podem ser obtidos num curto período de tempo e de forma menos dispendiosa. Com a realização de análises moleculares e tendo em conta os fatores promotores do crescimento das cianobactérias, será mais fácil prever, com antecedência, a ocorrência de *blooms* potencialmente tóxicos e selecionar o tipo de toxina a rastrear.

Os resultados demonstram também que as densidades de cianobactérias potencialmente tóxicas são motivo de elevada preocupação para as massas de água amostradas.

7. Referências Bibliográficas

1. Westrick, J. A., Szlag, D. C., Southwell, B. J. & Sinclair, J. (2010). A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* **397(5)**, 1705–14
2. Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C., & Humbert, J. F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **34(4)**, 361–377
3. Pearson, Leanne, Mihali, Troco, Moffitt, Michelle, Kellmann, Ralf & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* **8(5)**, 1650–80
4. Gerphagnon, M., Macarthur, D. J., Latour, D., Gachon, C. M. M., Van Ogtrop, F., Gleason, F. H. & Sime-Ngando, T. (2015). Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism. *Environ. Microbiol.* **17(8)**, 2573–2587
5. Paerl, H.W. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: Cyanobacterial Harmful Algal Blooms – State of Science and Research Needs. Hudnell, H.K (ed). Adv Exp Med Biol 619: 2.
6. Li, S., Ou, T. & Zhang, Q. (2013). Two Virus-like Particles that Cause Lytic Infections in Freshwater Cyanobacteria. *Virol. Sin.* **28(5)**, 303–305
7. Zanchett, G. & Oliveira-Filho, E. C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins (Basel)*. **5**, 1896–917
8. Kaebernick, M. & Neilan, B. a. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35(1)**, 1–9
9. Rastogi, R. P., Madamwar, D. & Incharoensakdi, A. (2015). Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Front. Microbiol.* **6**, 1–22
10. Boveri María & Renella Armando. Estado trófico de los lagos. at <<http://ced.agro.uba.ar/ubatic/?q=node/77>>
11. van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* **51(1)**, 7–60

12. Kurmayer, R. & Christiansen, G. (2009). The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. *Freshw. Rev.* **2(1)**, 31–50
13. Schembri, M. A., Neilan, B. A. & Saint, C. P. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* **16(5)**, 413–421
14. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* **59**, 303–27
15. Galvão, H., Reis, M. P., Domingues, R. B., Caetano, S. M., Mesquita, S., Barbosa, A. B., Costa, C., Vilchez, C. & Ribau Teixeira, M. (2012). Ecological Tools for the Management of Cyanobacteria Blooms in the Guadiana River Watershed , Southwest Iberia. *Stud. Water Manag. Issues* 159–192. at <<http://www.intechopen.com/publish-books.html>>
16. Sukenik, A., Quesada, A. & Salmaso, N. (2015). Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. *Biodivers. Conserv.* **24(4)**, 889–908
17. Galvão, H., Reis, M.P., Valério, E., Domingues, R., Costa, C., Lourenço, D., Condiño, S., Miguel, R., Barbosa, A., Gago, C., Faria, N., Paulino, S., Pereira, P. (2008). Cyanobacterial blooms in natural waters in southern Portugal: a water management perspective. *Aquat. Microb. Ecol.* **53**, 129–140
18. Bhattacharyya, S., Deep, P. R. & Nayak, B. (2015). Cyanobacteria and cyanotoxins in the World : Review. **1(8)**, 563–569
19. Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A. & Vasconcelos, V. (2013). Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *J. Appl. Microbiol.* **114(3)**, 605–20
20. Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. & Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* **33(4)**, 613–616
21. Paerl, H. W. & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* **65**, 995–1010
22. Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. *Microbiol. Rev.* **58(1)**, 94–144
23. Mur, R., Skulberg, O. M. & Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment in Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences monitoring and management (eds. Chorus, I. & Bartram, J.).

24. Díez, B. & Ininbergs, K. (2014) Ecological importance of cyanobacteria, in *Cyanobacteria: An Economic Perspective* (eds N. K. Sharma, A. K. Rai and L. J. Stal), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
25. Foss, A. J., Philips, E. J., Yilmaz, M. & Chapman, A. (2012). Characterization of paralytic shellfish toxins from *Lyngbya wollei* dominated mats collected from two Florida springs. *Harmful Algae* **16**, 98–107
26. Berry, J. P., Gibbs, P. D., Schmale, M. C., & Saker, M. L. (2009). Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **53(2)**, 289–299
27. Leão, P. N., Pereira, A. R., Liu, W.-T., Ng, J., Pevzner, P. a, Dorrestein, P. C., König, G. M., Vasconcelos, V. M. & Gerwick, W. H. (2010). Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107(25)**, 11183–8
28. Sharif, D. I., Gallon, J., Smith, C. J. & Dudley, E. (2008). Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium Gloeotheca PCC6909. *ISME J.* **2(12)**, 1171–82
29. Montgomery, K., Charlesworth, J., LeBard, R., Visscher, P. & Burns, B. (2013). Quorum Sensing in Extreme Environments. *Life* **3(1)**, 131–148
30. Rzymiski, P. & Poniedziałek, B. (2014). In search of environmental role of cylindrospermopsin: a review on global distribution and ecology of its producers. *Water Res.* **66**, 320–37
31. Carmichael, W. W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: ‘The CyanoHABs’. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **7(5)**, 1393–1407
32. Sukenik, A., Kaplan-Levy, R. N., Welch, J. M., & Post, A. F. (2012). Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria). *ISME J.* **6(3)**, 670–679
33. Sukenik, A., Beardall, J. & Hadas, O. (2007). Photosynthetic characterization of developing and mature akinetes of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanoprokaryota). *J. Phycol.* **43(4)**, 780–788
34. Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A. & Quesada, A. (2012). Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to Subtropical and Temperate Freshwater Lakes - Physiological, Regional, and Global Driving Forces. *Front. Microbiol.* **3**, 86
35. Cirés, S., Wörmer, L., Wiedner, C., & Quesada, A. (2013). Temperature-

- Dependent Dispersal Strategies of *Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanobacteria): Implications for the Annual Life Cycle. *Microb. Ecol.* **65(1)**, 12–21
36. Kokociński, M., Stefaniak, K., Mankiewicz-Boczek, J., Izydorczyk, K., & Soininen, J. (2010). The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). *Eur. J. Phycol.* **45(2)**, 365–374
 37. Seenayya, G., & Raju, N. S. (1972). On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. In. *Int. Symp. Taxon. Biol. Bluegreen Algae, 1st, Madras, 1970. Pap.*
 38. Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii*, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Für Hydrobiol. Suppl. Monogr. Beitrage* **107(4)**, 563–593
 39. Hill, H. (1970). *Anabaenopsis raciborskii* Woloszynska in Minnesota lakes. *J. Minnesota Acad. Sci.* **36**, 80–82
 40. Messineo, V., Melchiorre, S., Corcia, A. Di, Gallo, P. & Bruno, M. (2010). Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ. Toxicol.* **25(1)**, 18–27
 41. Caetano, S., Costa, C., Reis, M. P., Rodrigues, M. & Gago, C. (2015). ‘Are harmful cyanobacteria blooms increasing in frequency or intensity in Southern Portugal reservoirs?’ - Harmful Algal Blooms and Climate Change Scientific Symposium - May 19–22, 2015 Göteborg, Sweden. at https://pices.int/publications/book_of_abstracts/2015-HAB-Book-of-Abstracts.pdf
 42. Alster, A., Kaplan-Levy, R. N., Sukenik, A. & Zohary, T. (2010). Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean Lake. *Hydrobiologia* **639(1)**, 115–128
 43. Guiry, W. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland. at <http://www.algaebase.org>
 44. Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., Hoyos, C. De

- & Sukenik, A. (2006). Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur. J. Phycol.* **41(1)**, 39–45
45. Barón-Sola, Á., Gutiérrez-Villanueva, M. A., del Campo, F. F., & Sanz-Alfárez, S. (2013). Characterization of *Aphanizomenon ovalisporum* amidinotransferase involved in cylindrospermopsin synthesis. *Microbiologyopen* **2(3)**, 447–58
46. Preußel, K., Wessel, G., Fastner, J., & Chorus, I. (2009). Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* **8(5)**, 645–650
47. Üveges, V., Tapolczai, K., Krienitz, L. & Padisák, J. (2012). Photosynthetic characteristics and physiological plasticity of an *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria, Nostocaceae) winter bloom in a deep oligo-mesotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* **698(1)**, 263–272
48. Reis, M. P., Lourenço, D., Miguel, R., Mesquita, S., Coutinho, F. & Vilchez, C. (2005). Multivariate analysis of cyanobacteria blooms associated conditions in the Funcho Reservoir (Algarve - Portugal). *9th Symp. Aquat. Microb. Ecol. (SAME-9)*, Univ. Helsinki, Helsinki, Finland, 21-26 August.
49. Bornet, É. & Flahault, C. (1888). Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France (quatrième et dernier fragment). *Ann. des Sci. Nat. Bot.* **7**, 177–262
50. Preußel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I., & Fastner, J. (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* **47(2)**, 156–162
51. Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. & Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, cyanobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55(1)**, 11–26
52. Wood, S. A., Holland, P. T., Stirling, D. J., Briggs, L. R., Sprosen, J., Ruck, J. G., & Wear, R. G. (2006). Survey of cyanotoxins in New Zealand water bodies between 2001 and 2004. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **40(4)**, 585–597
53. Valério, E., Chaves, S. & Tenreiro, R. (2010). Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins (Basel)*. **2(10)**, 2359–2410
54. Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F. M. & Funari, E. (2016). Risk to

- human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* **8444**, 1–35
55. Falconer, I. R., & Humpage, A. R. (2005). Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2(1)**, 43–50
 56. Hyman, M. (2010). Glutathione: The Mother of All Antioxidants. *Huffingt. Post* 10–13
 57. Ding, X., & Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43(1)**, 149–173
 58. Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A. R., Mischke, U., Eaglesham, G. K. & Chorus, I. (2003). *Cylindrospermopsin* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* **42(3)**, 313–321
 59. Hoff-Riseti, C., Dörr, F. A., Schaker, P. D. C., Pinto, E., Werner, V. R., & Fiore, M. F. (2013). *Cylindrospermopsin* and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *PLoS One* **8(8)**, 74238
 60. Pearson, L. a & Neilan, B. a. (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19(3)**, 281–8
 61. Rodrigues, M. A., Reis, M. P. & Mateus, M. C. (2013). Liquid chromatography/negative electrospray ionization ion trap MS(2) mass spectrometry application for the determination of microcystins occurrence in Southern Portugal water reservoirs. *Toxicon* **74**, 8–18
 62. Blaha, L., & Marsalek, B. (2000). Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins : a review. *Arch. für Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* **134**, 1–22
 63. Sangolkar, L. N., Maske, S. S. & Chakrabarti, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Res.* **40(19)**, 3485–96
 64. Lino, C. M., Silva, L. J., & Pena, A. S. (2006). Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Quim.*

65. Clare Smith. Disadvantages & Advantages of an HPLC. at
<http://www.ehow.com/list_5911530_disadvantages-advantages-hplc.html>
66. Métodos Laboratoriais Utilizando Anticorpos. at
<www.labimuno.org.br/aulas/aula_imunodiagnóstico.ppt>
67. Robinson, R. & Pellenz, S. An Introduction to ELISA. at
<<http://www.antibodies-online.com/resources/17/1246/Enzyme-linked+immunosorbent+assay+ELISA/>>
68. UNH Manchester. Advantages and Disadvantages of ELISA. at
<<http://prescottbiochem09.wikispaces.com/Advantages+Versus+Disadvantages+of+ELISA>>
69. Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* **51(12)**, 2415–8
70. Acs, A., Kovács, A. W., Csepregi, J. Z., Törő, N., Kiss, G., Győri, J., Vehovszky, A., Kováts, N. & Farkas, A. (2013). The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicol* **70**, 98–106
71. Brandhorst, G., Oellerich, M., Maine, G., Taylor, P., Veen, G. & Wallemacq, P. (2012). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry or Automated Immunoassays: What Are the Future Trends in Therapeutic Drug Monitoring? *Clin. Chem.* **58(5)**, 821–825
72. Oehrle, S. a, Southwell, B. & Westrick, J. (2010). Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicol* **55(5)**, 965–72
73. Gargošová, H. Z., Vávrová, M., Doležalová, H., Weissmannová, L. M., Vydrová, L., & Zouhar, L. (2010). The use of methods of environmental analysis and ecotoxicological tests in the evaluation of wastewater. Wastewater - evaluation and management, (ed. Prof. Fernando Sebastião Garcia Einschlag). 953–978
74. Eaglesham, G. K., Norris, R. L., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Davis, B. C., Neville, G. R., Seawright, A. A. & Moore, M. R. (1998). Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue–green algal toxin, for public health purposes. *Environ. Toxicol.* **14(1)**, 151–154
75. World Health Organization. (2003). Algae and cyanobacteria in freshwater. In: Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Vol.1 - Coastal and fresh

- waters (Chapter 8). *WHO Publ. Geneva, Switz.* 136–158
76. Cirés, S., Wörmer, L., Ballot, A., Agha, R., Wiedner, C., Velázquez, D., Casero, M. C. & Quesada, A. (2014). Phylogeography of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxin-producing Nostocales cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* **80(4)**, 1359–1370
 77. Zurita, J. L., Jos, Á., Peso, A. D., Salguero, M., López-Artíguez, M., & Repetto, G. (2005). Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. *Aquat. Toxicol.* **75(2)**, 97–107
 78. Gilpin, A. (1996). *Dictionary of Environment and sustainable development.*
 79. Ecotoxicologia. at <apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf>
 80. Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., Espindola, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova* **31(7)**, 1820–1830
 81. Thomas, D. J. L., Tyrrel, S. F., Smith, R. & Farrow, S. (2009). Bioassays for the evaluation of landfill leachate toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* **12(1)**, 83–105
 82. Blinova, I. (2004). Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ. Toxicol.* **19(4)**, 425–428
 83. Science Buddies Staff. Using *Daphnia* to Monitor Water Toxicity. at <http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/EnvSci_p043.shtml>
 84. Fonseca, H., Dias, N., Nicolau, A., & Lima, N. (2006). Estudo in vitro da toxicidade de corantes têxteis azo em *Tetrahymena pyriformis*.
 85. Palma, P. (2009). Estudo de Pesticidas com Características de Desregulação Endócrina Quantificados na Albufeira do Alqueva.
 86. Silva, C. S. L. . (2012). Utilização de Ensaio Ecotoxicológicos na Avaliação de Risco Ambiental Promovido por Pesticidas: caso-estudo Brejo do Cagarrão.
 87. Callisto, M., Moretti, M., & Goulart, M. (2001). Macroinvertebrados Bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Rev. Bras. Recur. hidricos* **6(1)**, 71–82
 88. Asker, S. (2011). Ecotoxicological test methodology for environmental screening of the European Water Framework Directive’s priority substances adjusted to Swedish regional conditions.
 89. Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M.,

- Minoru, K., Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* **34(2)**, 227–232
90. Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S. M. & Cáceres, A. (2010). Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Rev. Bras. Farmacogn.* **20(6)**, 897–903
91. Bakouli, P., Karadima, C., Rouvalis, A. & Iliopoulou-Georgudaki, J. (2008). Acute toxicity evaluation of an insecticide used in potato cultures with the use of bioassays. *Fresenius Environ. Bull.* **17(8)**, 1002–1006
92. The University of Nottingham. (2011). QS in *Vibrio Fischeri*. at <<http://www.nottingham.ac.uk/quorum/fischeri2.htm>>
93. Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., Schaefer, A., Stabb, E., Stevens, A., Visick, K., Whistler, C. & Greenberg, E. P. (2005). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102 (8)**, 3004–3009
94. Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomšíčková, J., Zapomělová, E., Skácelová, K., ... & Kopecký, J. (2011). Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* **57(1)**, 76–83
95. Sabour, B., Loudiki, M., Oudra, B., Vasconcelos, V., Martins, R., Oubraim, S., & Fawzi, B. (2002). Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environ. Toxicol.* **17(1)**, 24–31
96. Ferrão-Filho, A. D. S., Soares, M. C. S., de Magalhães, V. F. & Azevedo, S. M. F. O. (2010). A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environ. Pollut.* **158(6)**, 2084–93
97. Saker, M. L., Nogueira, I. C., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. K., & Pereira, P. (2003). First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **55(2)**, 243–250
98. ISO 6341. (1996). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneve, Switzerland.
99. Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, a M. V. M. & Barbosa, I. R.

- (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **81(5)**, 485–9
100. Personne, G. 1999. THAMNOTOXKIT F TM - Crustacean toxicity screening test for Freshwater. Standard Operational Procedure. Belgium. pp 3-21.
 101. ISO 11348-2. (1998). Water quality–Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)–Part 2: Method using liquid-dried bacteria. Geneve, Switzerland.
 102. ISO 11348-3. (1998). International Standard for Water Quality: Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 3: method using freeze-dried bacteria. Geneve, Switzerland.
 103. EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva. (2013). O que é o Alqueva. at <<http://www.edia.pt/pt/o-que-e-o-alqueva/fins-multiplos/104>>
 104. Barragem do Enxoé. at <<http://www.freguesiadepias.pt/index.php/infra-estruturas/19-barragem-do-enxoe>>
 105. Barragem do Roxo. at <<http://www.mun-aljustrel.pt/menu/526/barragem-do-roxo.aspx>>
 106. (2015). Rio Ardila. at <<http://www.allaboutportugal.pt/moura/natural-resources/rio-ardila>>
 107. Durão, A., Morais, M. M., Chambe-Leitão, P., Brito, D., Fernandes, R. M. & Neves, R. (2012). Estimation of transported pollutant load in Ardila catchment using the SWAT model. *J. Environ. Sci. Eng. B* **1(10)**, 1179–1191
 108. Cabellos, J. A.R. & Matoso, A. (2011): ‘Experiência de coordenação dos planos de gestão de Espanha e Portugal para a região hidrográfica do Guadiana’. 9^a Assembleia Geral da Rede Mediterrânea de Organismos de Bacia – MENBO, Porto, 27-30 Set.
 109. INAG. (2009). Manual para a avaliação da qualidade biológica da água em lagos e albufeiras segundo a Directiva Quadro da Água. Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton. *Ministério do Ambient. do Ordenam. do Territ. e do Desenvolv. Reg. Inst. da Água, IP.*
 110. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971).

- Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35(2)**, 171–205
111. Rippka, R., Neilson, A., Kunisawa, R. & Cohen-Bazire, G. (1971). Nitrogen fixation by unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **76(4)**, 341–348
 112. Guillard R.R.L. and Ryther J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Clece) Gran. *Can. J. Microbiol* **8(2)**, 229–239
 113. Llabrés, M., Agustí, S., Alonso-Laita, P. & Herndl, G. J. (2010). *Synechococcus* and *Prochlorococcus* cell death induced by UV radiation and the penetration of lethal UVR in the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **399**, 27–37
 114. Bertozzini, E., Penna, A., Pierboni, E., Bruce, I. & Magnani, M. (2005). Development of new procedures for the isolation of phytoplankton DNA from fixed samples. *J. Appl. Phycol.* **17(3)**, 223–229
 115. Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Manipulation of nucleic acids. *in Molecular Biology* (125–161). Elsevier
 116. Urbach, E., Robertson, D. L. & Chisholm, S. W. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**, 267–270
 117. Rinta-Kanto, J. M., Ouellette, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B. & Wilhelm, S. W. (2005). Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* **39(11)**, 4198–4205
 118. Wilson, K. M., Schembri, M. a., Baker, P. D. & Saint, C. P. (2000). Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(1)**, 332–338
 119. Schembri, M. A., Neilan, B. a, Christopher, P. & Saint, C. P. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* **16**, 413–421
 120. Fergusson, K. M. & Saint, C. P. (2003). Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environ. Toxicol.* **18(2)**, 120–125
 121. Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., & Humbert, J. F. (2005). Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Microbiology* **71(2)**, 4393–4396

122. Mihali, T. K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K. D. & Neilan, B. a. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(3)**, 716–22
123. Soto-Liebe, K., Murillo, A. A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J. J., Trefault, N., Cembella, A. & Vásquez, M. (2010). Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* **56(8)**, 1350–1361
124. Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Sukenik, A. & Dittmann, E. (2012). The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Front. Microbiol.* **3**, 1–11
125. American Society for Microbiology. (2014). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. at <<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>>
126. Stüken, A. & Jakobsen, K. S. (2010). The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. *Microbiology* **156(8)**, 2438–51
127. Bio-Rad Laboratories. (2016). PCR Troubleshooting. at <<http://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel2>>
128. New England Biolabs. (2016). PCR Troubleshooting Guide. at <<https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>>
129. Sinha, R., Pearson, L. a, Davis, T. W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., Burford, M. a & Neilan, B. a. (2014). Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics* **15(83)**, 1471–2164
130. Neilan, B. a., Pearson, L. a., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C. & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* **15**, 1239–1253
131. Törökné, A., Vasdinnyi, R. & Asztalos, B. M. (2007). A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol.* **22(1)**, 64–68
132. Palma, P., Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., López de Alda, M. J., Barceló, D. & Barbosa, I. R. (2009). Risk

- assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Int.* **35(3)**, 545–551
133. Palma, P., Köck-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., Barbosa, I. R., De Alda, M. L., & Barceló, D. (2014). Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). *Sci. Total Environ.* **488-489 (1)**, 208–219
134. Bellém, F., Nunes, S. & Morais, M. (2013). Cyanobacteria toxicity: potential public health impact in South Portugal populations. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **76(4-5)**, 263–71
135. Caetano, S., Costa, C., Rodrigues, M., Vidal, F., Mateus, M. C., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., Barbosa, I. R. & Reis, M. P. (2013). Repeated major late summer *Cylindrospermopsis raciborskii* blooms in Alqueva reservoir and their toxicity risk. II International Conference on Occupational and Environmental Toxicology, Porto, Portugal.

AneXos

8. Anexos

○ Anexo I - Preparação do meio de cultura BG11

(Adaptado de Stanier *et al.* (1971) e modificado por Ripka *et al.* (1979))

1. Esterilizar água desionizada, a 121 °C durante 25 minutos, e deixar arrefecer;
2. Adicionar de forma ordenada as soluções *stock* da Tabela 12, já preparadas e previamente esterilizadas, na câmara de fluxo laminar vertical;
3. Acertar o pH entre 7,0 e 7,2;
4. Armazenar o meio BG11 à temperatura ambiente.

Tabela 12 - Nutrientes que constituem o meio nutritivo BG11 e respectivas diluições adicionados à água desionizada estéril para a solução final

Nutrientes	Solução <i>stock</i> (g.L ⁻¹)	Volume de solução <i>stock</i> (mL.L ⁻¹)
NaNO ₃	150,0	10,0
K ₂ HPO ₄	6,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	15,0	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	7,2	1,0
Na ₂ CO ₃ *	4,0	1,0
Ácido cítrico	1,2	1,0
Citrato de ferro III*	1,2	1,0
EDTA	0,2	1,0
Solução de metais traço	(Tabela 13)	1,0

*As soluções *stock* 5 e 7 devem ser filtradas por filtro de seringa (Acrodisc) de 0,45 µm antes de serem adicionadas.

A solução de metais traço foi preparada de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13 - Nutrientes que constituem a solução de metais traço e respectivas diluições adicionados à água desionizada estéril para a solução final

Nutrientes para a solução de metais traço	Solução <i>stock</i> (g.L⁻¹)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
NaMo ₄ .5H ₂ O	0,390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049

○ **Anexo II – Solução de Vitaminas**

(Adaptado de Guillard & Ryther (1962) e de Guillard (1975))

1. Para a preparação da solução de vitaminas são necessários os seguintes reagentes:
 - ❖ Vitamina B 12 (Cobalamina)
 - ❖ Vitamina B 7 (Biotina)
 - ❖ Vitamina B 1 (Tiamina)
2. Preparação das soluções *stock* de acordo com a Tabela 14:

Tabela 14 - Preparação das soluções *stock* das vitaminas B12 e B7 utilizando como solvente água destilada

Reagentes	Solução (g.L⁻¹)
Vitamina B 12	5,5
Vitamina B 7	5
Vitamina B 1	0,1

3. Esterilizar 10 minutos a 110°C
4. Após arrefecer, fazer alíquotas de 1 mL e conservar a -20°C

○ **Anexo III – Resultados das ampliações para genes associados à produção de cilindrospermopsinas**

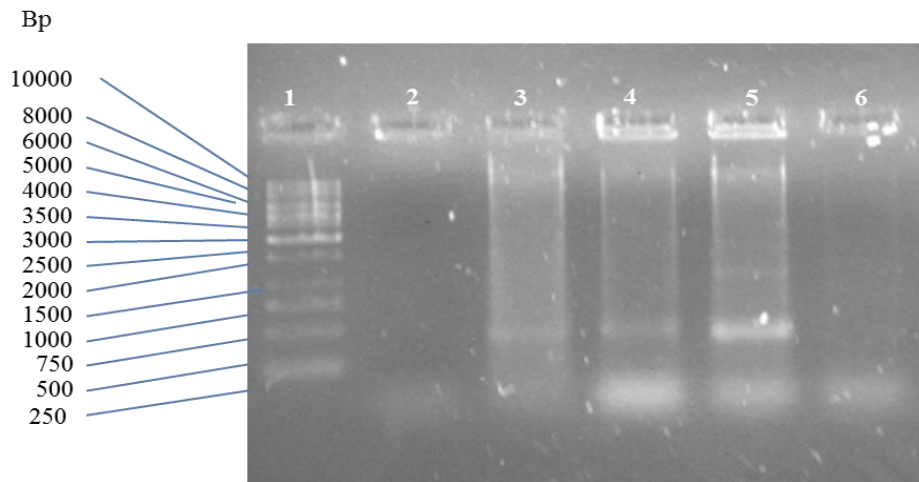


Figura 8. 1 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* K18 e M5. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – **Cultura em *stress* de luz e estando em senescência**; 4 - **Cultura em condição *normal* na qual houve libertação de carotenóides**; 5 – **Cultura em *stress* de luz mas mantendo-se verde**; 6 - *Limnothrix* sp.. Resultados positivos para o fragmento alvo de 450 bp realçados a negrito na legenda. Gel corado com EZ Vision® adicionado à agarose.

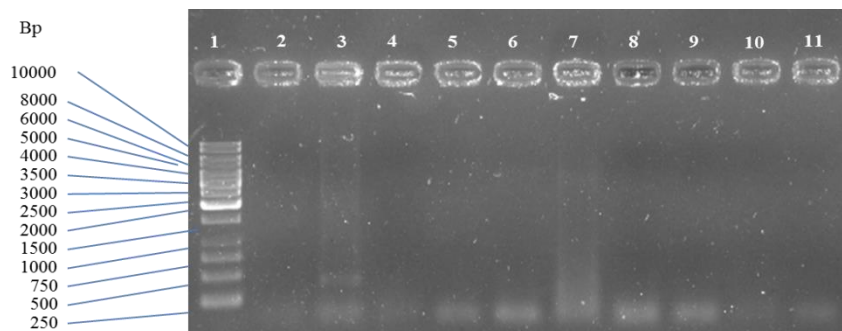


Figura 8. 2- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* K18 e M5. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - **Cultura em condição *normal* na qual houve libertação de carotenóides**; 4 - Ribeira de Alcarrache (2015); 5 – Mourão (2015); 6 - Marina da Amieira (2015); 7 - Barragem do Roxo (2015); 8 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 9 – Monsaraz, Telheiro (2015); 10 – *Limnothrix* sp.; 11 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820. Resultados positivos para o fragmento alvo de 450 bp realçados a negrito na legenda. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

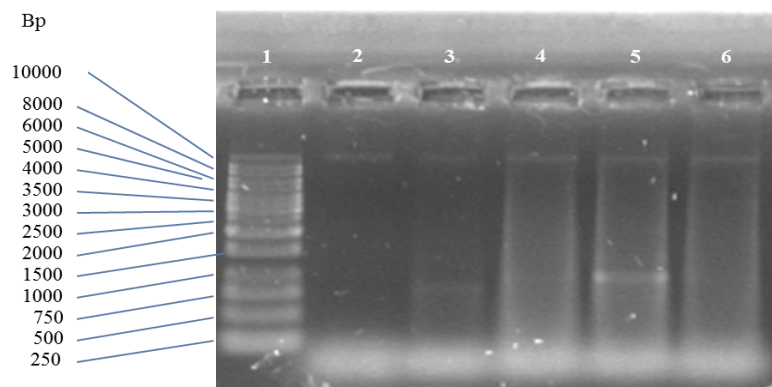


Figura 8. 4 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M4 e M5. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 4 – Cultura em *stress* de luz e estando em senescência; 5 - Cultura em condição *normal* na qual houve libertação de carotenóides; 6 – Cultura em *stress* de luz mas mantendo-se verde.

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 650 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

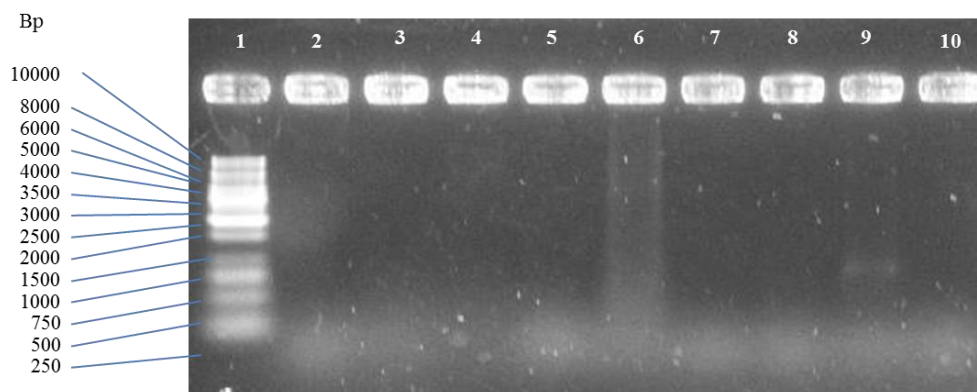


Figura 8. 3- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M4 e M5. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - Ribeira de Alcarrache (2015); 4 – Mourão (2015); 5 - Marina da Amieira (2015); 6 - Barragem do Roxo (2015); 7 - Cais ancodouro de Monsaraz (2015); 8 – Monsaraz, Telheiro (2015); 9 – *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 – *Limnothrix* sp..

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 650 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

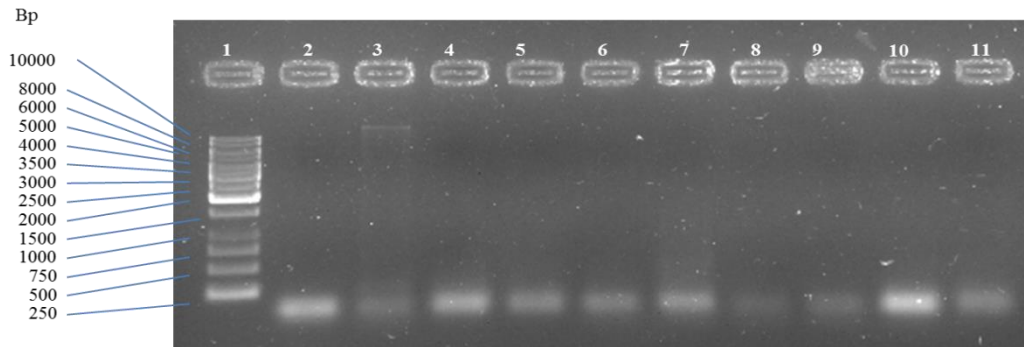


Figura 8. 5 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M13 e M14. 1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 4 - Ribeira de Alcarrache (2015); 5 – Mourão (2015); 6 - Marina da Amieira (2015); 7 - Barragem do Roxo (2015); 8 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 9 – Monsaraz, Telheiro (2015); 10 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 11 – *Limnothrix* sp..

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 597 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

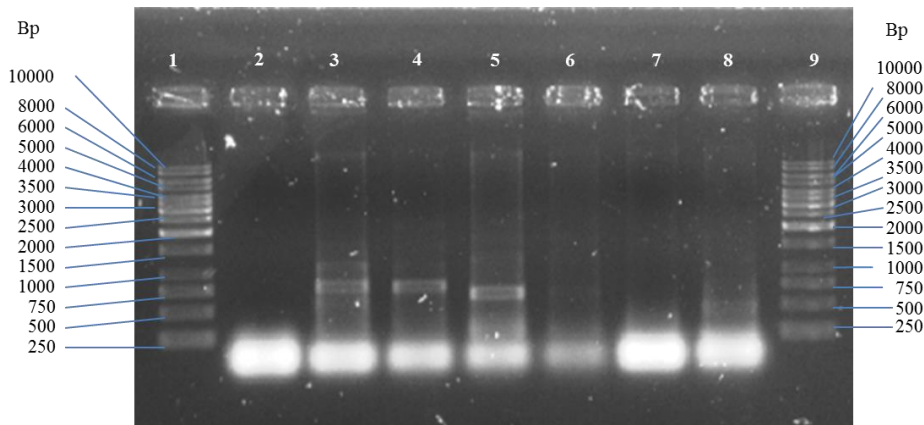


Figura 8. 6 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M13 e M14.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – *C. raciborskii* de Lucefécit Setembro 2012; 4 - *C. raciborskii* de Mourão Setembro 2011 (fixada com Lugol); 5 – **Cultura C₂E₂ 2^aeluição**; 6 - Cultura C₂F₂ 2^aeluição; 7 – *Limnothrix* sp.; 8 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820.

Resultado positivo para o fragmento alvo de 597 bp realçado a negrito. Gel corado com EZ Vision® adicionado à agarose.

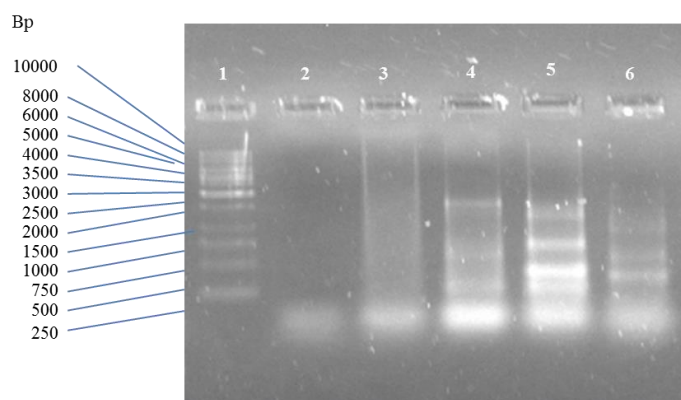


Figura 8. 8 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* M13 e M14.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura em *stress* de luz e estando em senescência; **4 - Cultura em condição normal na qual houve libertação de carotenóides**; 5 – Cultura em *stress* de luz mas mantendo-se verde; **6 – *Limnothrix* sp..**

Resultados positivos para o fragmento alvo de 597 bp realçados a negrito. Gel corado com EZ Vision® adicionado à agarose.

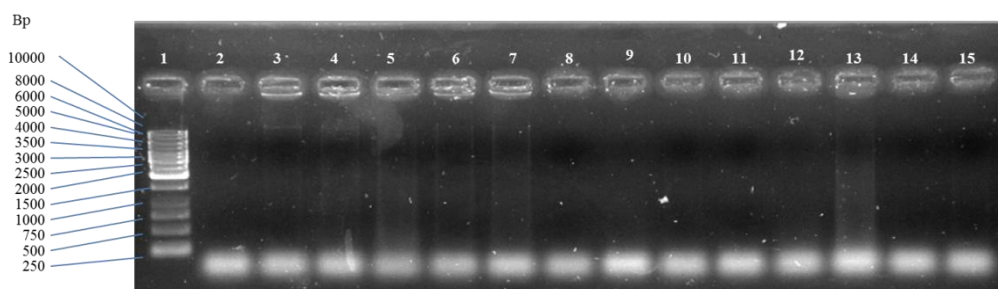


Figura 8. 7 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* CynsulF e Cynam R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 – Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 780 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

○ **Anexo IV – Resultados das ampliações para genes associados à produção de saxitoxinas**

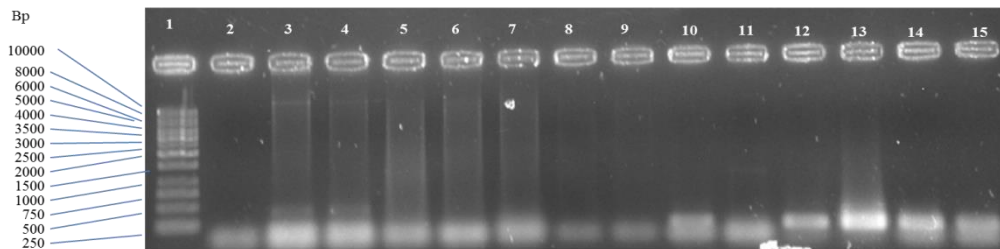


Figura 8. 9 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt A4 F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 - Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 3600 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

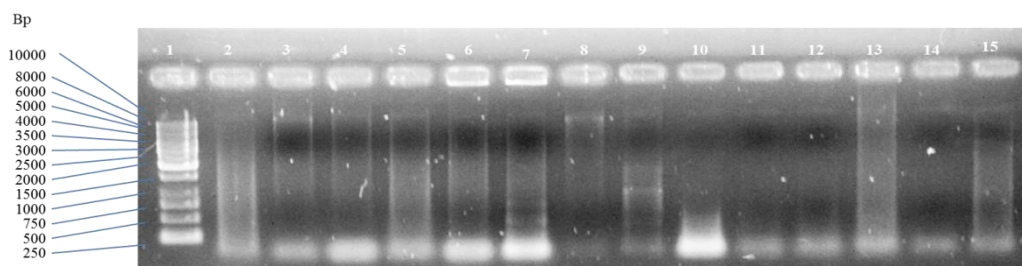


Figura 8. 10 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt A F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 - Cultura C_2E_2 ; 4 – Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 1405 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

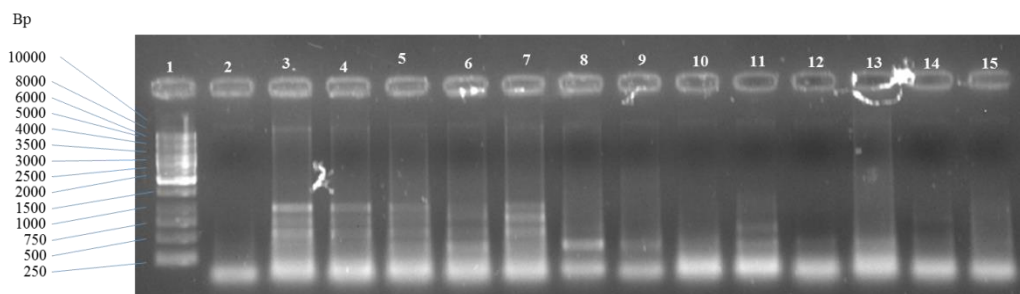


Figura 8. 12- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt N F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 - Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 1405 bp realçados a negrito. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

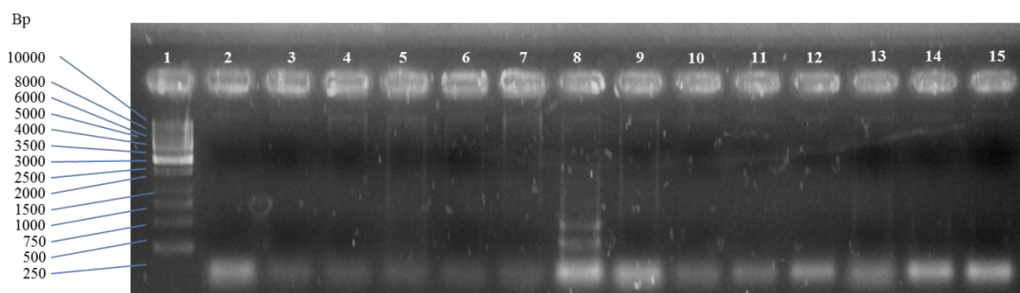


Figura 8. 11 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt W F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 – Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 430 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

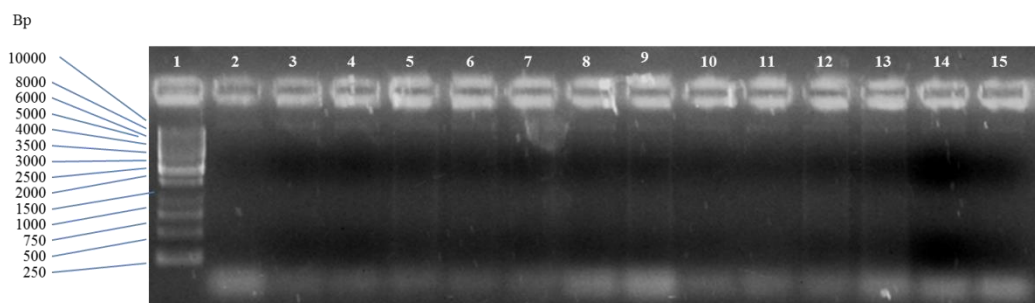


Figura 8. 13- Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt V F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 – Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieria (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 1829 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.

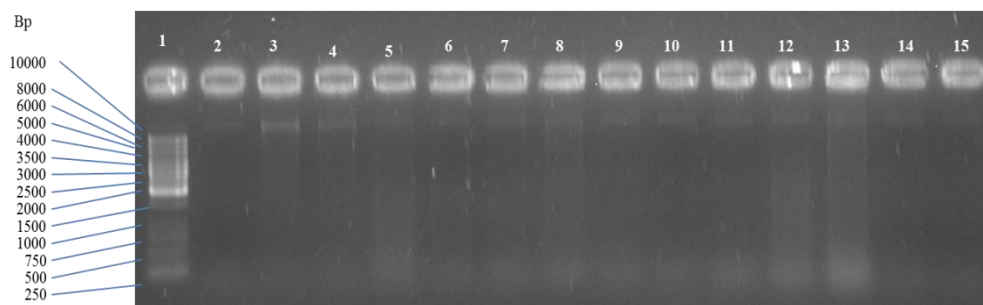


Figura 8. 14 - Visualização em gel de agarose dos amplicões obtidos com os *primers* Sxt X F e R.

1 – Marcador (Escala DNA de 250 bp a 1 kbp); 2 – água ultrapura estéril; 3 – Cultura C_2E_2 ; 4 - Cultura C_2F_2 ; 5 - Cultura exposta a excesso de luz e estando em senescência; 6 - Cultura exposta a luz normal na qual houve libertação de carotenóides; 7 - Cultura exposta excesso luz mas estando verdes; 8 – *Limnothrix* sp.; 9 - *Microcystis aeruginosa* PCC 7820; 10 - Ribeira de Alcarrache (2015); 11 – Mourão (2015); 12 - Marina da Amieira (2015); 13 - Barragem do Roxo (2015); 14 - Cais ancoradouro de Monsaraz (2015); 15 – Monsaraz, Telheiro (2015).

Sem resultados positivos para o fragmento alvo de 921 bp. Gel corado em *post-staining* com GelRedTM.