

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Comparação de métodos de identificação e
quantificação de cianobactérias e suas toxinas na
Albufeira do Torrão (Rio Tâmega)**

Ana Vanessa Basto Regueiras

Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia
Ambientais

2009

Ana Vanessa Basto Regueiras

**Comparação de métodos de identificação e quantificação de
cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio
Tâmega)**

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em
Contaminação e Toxicologia Ambientais submetida
ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar e Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto.

Orientador – Professor Doutor Vítor Vasconcelos

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Vítor Vasconcelos, que me “apresentou” pela primeira vez a problemática das cianobactérias ainda durante a licenciatura conseguindo cativar-me. Agradeço-lhe também pela orientação do trabalho, mas essencialmente pela calma e confiança que sempre me transmitiu.

A todas as pessoas ligadas ao Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE), gostaria de agradecer pelo óptimo ambiente e bom-humor e por toda a ajuda que cada um deu, mesmo que só para falar e relaxar um pouco.

Em particular, do LEGE, gostaria ainda de agradecer:

À Marisa, que me acompanhou em todo este ano, ajudando-me em cada momento.

Ao António, por toda a ajuda que me deu na parte molecular, nas amostragens e pela disponibilidade para tirar qualquer dúvida a qualquer momento.

À Micaela pela ajuda nas identificações das cianobactérias e na análise de ELISA.

À Viviana por toda a ajuda prestada na identificação e isolamento das cianobactérias, assim como a ajuda na preparação das amostras para MALDI-TOF MS.

À Cristiana, minha companheira de amostragens, pela ajuda na parte molecular.

À Joana, pela ajuda no HPLC.

Ao Vítor, Isabel e Rosário pela ajuda na identificação.

Ao Dr. Martin Welker, do Technische Universität Berlin na Alemanha, por realizar a análise de MALDI-TOF MS.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio, através do Projecto PTDC/AMB/67075/2006.

A todos os professores do ano curricular do mestrado, por tudo o que me ensinaram, e que me ajudou na execução da tese.

A toda a minha família, em especial a minha avó, que em cada momento soube sempre as palavras certas que me ajudaram a percorrer este caminho até aos dias de hoje. À minha irmã, Andreia, por me aturar durante a escrita da tese.

Ao Filipe, que me tem acompanhado e apoiado. Por toda a paciência e calma que me transmitiu nos momentos de maior stress.

À minha Mãe, que fez de mim o que sou hoje e a quem tenho tudo para agradecer e a quem dedico este trabalho.

Resumo

As cianobactérias são organismos procarióticos que habitam ambientes terrestres e aquáticos. Apesar da diversidade de estudos já efectuados acerca da ocorrência destes organismos em sistemas dulciaquícolas, muito permanece ainda por esclarecer. A proliferação de cianobactérias ocorre essencialmente nos meses de verão, no entanto, recentemente, têm-se observado casos de persistência destes organismos e da produção de cianotoxinas ao longo do ano. A detecção precoce de estirpes de cianobactérias tóxicas em amostras de água é indispensável para a prevenção de problemas de saúde pública, permitindo a aplicação atempada de medidas correctivas.

O objectivo deste trabalho foi monitorizar o aparecimento de cianobactérias e suas toxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina) por diferentes metodologias, Microscopia, PCR e PCR em tempo Real, ELISA, HPLC e MALDI-TOF MS, e otimizar os volumes de amostragem necessários para essa monitorização.

A albufeira do Torrão, no rio Tâmega, foi o local escolhido por apresentar um historial de aparecimento de florescências de cianobactérias tóxicas. Dois locais de amostragem foram seleccionados, um junto à cidade do Marco de Canaveses, onde existe um local de captação de água para consumo, e um outro local, a jusante, junto a barragem hidroeléctrica do Torrão. As amostragens realizaram-se entre o final do Verão e princípio do Outono, de modo a verificar a persistência de cianobactérias para além dos meses mais quentes.

Na albufeira do Torrão verificou-se, além de ocorrência de cianobactérias, a produção de microcistinas, com valores sempre mais elevados no Marco, até 10,62µg/L de MC-LR equivalente, do que no Torrão. As espécies *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* mostraram ter ciclos alternados de dominância, com a primeira a dominar nas duas primeiras datas e a segunda nas últimas. *M. aeruginosa* aparentou ser a principal produtora de microcistinas. Nas amostras naturais verificou-se a ocorrência simultânea, dentro da mesma espécie de *M. aeruginosa*, de estirpes potencialmente produtoras de microcistinas e outras não produtoras. Verificou-se que de uma maneira geral, volumes tão pequenos como de 50mL parecem ser suficientes para análises moleculares. Quanto maior a quantidade de cianobactérias, de sedimentos e de inibidores naturais, menor deverá ser o volume amostrado.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que uma análise multidisciplinar parece ser a mais acertada para a monitorização de cianobactérias e suas toxinas.

O uso de técnicas moleculares em combinação com técnicas que permitem a quantificação da toxina providenciam uma informação completa para protecção da população de riscos para a saúde.

Abstract

Cyanobacteria are prokaryotic organisms that inhabit terrestrial and aquatic environments. In spite of the relatively high number of studies concerning the occurrence of these organisms in freshwater ecosystems, much remains for clarifying. Proliferation of cyanobacteria occurs essentially in warmer months, however, recently, cases of persistence of these organisms and production of cyanotoxins throughout the year have been observed. The early warning of toxic cyanobacteria strains in water samples is essential for prevention of public health problems, allowing the prompt application of corrective measures.

The aim of this study was to monitor the occurrence of cyanobacteria and their toxins (microcystin, nodularin and cylindrospermopsin) using different methodologies, like microscopy, PCR and Real-Time PCR, ELISA, HPLC and MALDI-TOF MS, and to optimize sampling volumes collection.

Torrão reservoir, in Tâmega river, was chosen because of the history of cyanobacteria blooms and toxins appearance. Two sampling locations were selected, one next to the city of Marco de Canaveses (Marco), near a water supply for human consumption, and another site, downstream, next to Torrão hydroelectric-power dam (Torrão). Samples were collected between the end of the summer and beginning of autumn, in order to quantify the persistence of cyanobacteria beyond the hottest months.

In Torrão reservoir apart from the occurrence of cyanobacteria, we detected the production of microcystins, with the highest values in all sampling dates for Marco: 10,62µg/L of MC-LR equivalents. *M. aeruginosa* and *A. flos-aquae* showed a seasonal cycle of dominance, with the first one dominating in the two first sampling dates and the second in the last ones. According to the results, *M. aeruginosa* seems to be the main microcystin producer. In environmental samples we detected the simultaneous occurrence of potentially microcystin producing strains and non producing ones of *M. aeruginosa*. It was also confirmed that small sampling volumes, such as 50mL, seems to be enough for molecular analyses. As big the amount of cyanobacteria, sediments and natural inhibitors, as small should be the sampling volume.

The results of this study suggest that a multidisciplinary analysis seems to be the best way to monitor cyanobacteria and their toxins in freshwaters.

Molecular techniques in combination with techniques that allow the quantification of the cyanotoxins provide complete information for population protection from health risks.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Biologia das cianobactérias	1
1.2.	Cianotoxinas.....	4
1.2.1.	Hepatotoxinas: microcistinas e nodularinas	6
1.2.2.	Citotoxinas: cilindrospermopsina	8
1.3.	Ocorrência de cianobactérias e suas toxinas em Portugal.....	10
1.4.	Metodologias para identificação de cianobactérias e suas toxinas	11
1.5.	Objectivos.....	16
2.	Materiais e métodos	17
2.1.	Área de estudo	17
2.1.1.	Caracterização dos locais de amostragem	17
2.2.	Amostragem de cianobactérias.....	19
2.3.	Isolamento, cultura e identificação de cianobactérias	20
2.4.	Análise molecular	22
2.4.1.	Extracção de DNA	22
2.4.2.	Quantificação do DNA	24
2.4.3.	Amplificação por PCR.....	24
1.1.1.	Preparação das amostras para sequenciação	26
1.1.2.	Amplificação por PCR em tempo real	28
1.2.	Ensaio enzimático ELISA	30
1.2.1.	Preparação das amostras.....	30
1.2.2.	Detecção de toxinas por ELISA	31
1.3.	Detecção e quantificação de microcistinas por HPLC.....	32
1.3.1.	Preparação das amostras.....	32
1.3.2.	Detecção e quantificação por HPLC de microcistinas.....	33
1.1.	Detecção de toxinas por MALDI-TOF MS.....	34
2.	Resultados.....	35

2.1. Parâmetros físico-químicos e ocorrência de cianobactérias nos locais amostrados	35
2.2. Isolamento e cultura de cianobactérias.....	39
2.3. Identificação de cianobactérias (fenotípica e genotípica)	42
2.4. Análise de PCR para detecção de espécies potencialmente produtoras de toxinas e de genes envolvidos na produção destas.....	44
2.4.1. Amostras ambientais	46
2.4.2. Amostras ambientais para otimização do volume	47
2.4.3. Estirpes isoladas	49
2.5. Quantificação das toxinas por ELISA e HPLC	51
2.6. Detecção das toxinas por MALDI-TOF MS	54
2.7. Análise por PCR em Tempo Real	55
3. Discussão	60
3.1. Parâmetros físico-químicos, ocorrência, cultura e identificação (fenotípica e genotípica) de cianobactérias.....	60
3.2. Amostras ambientais	66
3.3. Amostras ambientais para otimização do volume de amostragem.....	74
3.4. Estirpes isoladas.....	76
4. Conclusão.....	81
5. Bibliografia.....	85
Anexo I.....	I
Anexo II.....	V
Anexo III.....	XII
Anexo IV	XVI

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química da microcistina-LR, caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R) como L-aminoácidos nas posições 2 e 4 (Funari e Testai 2008).	7
Figura 2 - Estrutura química de uma nodularina (Funari e Testai 2008).	7
Figura 3 - Estrutura química da cilindrospermopsina (Funari e Testai 2008).	9
Figura 4 - Locais de amostragem (imagem obtida através do software Google Earth 5.0.11733.9347).	18
Figura 5 - Albufeira do Torrão. Local de amostragem: Marco.	18
Figura 6 - Albufeira do Torrão. Local de amostragem: Torrão.	18
Figura 7 - Esquema do plano de amostragem e posterior metodologia laboratorial.	20
Figura 8 - Cultura de cianobactérias em meio Z8, em tubos de ensaio estéreis de poliestireno de 12ml.	21
Figura 9 - Cultura de cianobactérias em meio Z8 sólido, em placas de petri de poliestireno estéreis.	21
Figura 10 – Cultura de cianobactérias em meio Z8, em frascos de poliestireno estéreis de 50mL.	21
Figura 11 – Crescimento de cianobactérias.	21
Figura 12 – Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb) (a) e 100bp EZ Load Molecular Ruler (BioRad) (b).	23
Figura 13 - Valores de temperatura superficial da água (°C) determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.	35
Figura 14a e 14b - Valores de oxigénio dissolvido (mg/L) e saturação de oxigénio (%) determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.	36
Figura 15 - Valores de pH determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem. .	36
Figura 16 - Valores de condutividade determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.	36
Figura 17 - Florescência de cianobactérias no Marco na data de 19-Set.	37
Figura 18 - Fotografias de espécies de cianobactérias identificadas por microscopia óptica. .	38
Figura 19 - Morfotipos de <i>M. wesenbergii</i> identificados em cultura de laboratório, nas diferentes datas do Torrão e do Marco.	40
Figura 20 - Produto da amplificação para o gene <i>16S rRNA</i> para as estirpes 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22; (+) Controlo positivo; (B) controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)	42
Figura 21 - Produto da amplificação dos fragmentos <i>16S rRNA</i> específico de <i>Microcystis sp.</i> , <i>mcyA</i> e <i>mcyB</i> para um volume de 20µL, numa reacção de multiplex PCR. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb).....	45
Figura 22 – Produto da amplificação do fragmento do gene <i>mcyA</i> para um volume de 20µL. (1) Marco 19-Set; (2) Marco 1-Out; (3) Marco 15-Out; (4) Marco 29-Out; (5) Torrão 19-	

Set; (6) Torrão 1-Out; (7) Torrão 15-Out; (8) Torrão 29-Out; (+) Controlo positivo (estirpe M6); (B) Controlo negativo.	46
Figura 23 - Produto da amplificação do gene HEP para um volume de 20µL. (1-4) Marco 19-Set; (5-7) Marco 1-Out; (8-11) Torrão 19-Set; (12-14) Torrão 1-Out; (1) 15mL; (2) 50mL; (3) 250mL; (4) 500mL; (5) 250mL; (6) 500mL; (7) 1000mL; (8) 50mL; (9) 250mL; (10) 500mL; (11) 1000mL; (12) 250mL; (13) 500mL; (14) 1000mL; (+) Controlo positivo (estirpe M6); (B) Controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)	48
Figura 24 - Produto da amplificação do fragmento do gene <i>mcyA</i> para um volume de 20µL. (1-4) Marco 19-Set; (5-7) Marco 1-Out; (8-11) Torrão 19-Set; (12-14) Torrão 1-Out; (1) 15mL; (2) 50mL; (3) 250mL; (4) 500mL; (5) 250mL; (6) 500mL; (7) 1000mL; (8) 50mL; (9) 250mL; (10) 500mL; (11) 1000mL; (12) 250mL; (13) 500mL; (14) 1000mL; (15) Controlo positivo (estirpe M6); (16) Controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb).....	48
Figura 25 - Produto da amplificação para o fragmento do gene <i>mcyB</i> para as estirpes 1, 7, 11, 16 e 18; (+) Controlo positivo; (B) controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb).....	50
Figura 26 - Comparação dos resultados da análise de ELISA para as amostras ambientais. Os valores estão expressos em µg MC-LR equivalentes por litro. ELISA AA corresponde ao ensaio de ELISA para a quantidade de toxina existente no meio e ELISA AT a quantidade total da toxina (toxina no meio+toxina endógena).....	52
Figura 27 - Cromatograma resultante da análise de HPLC para a amostra ambiental do Marco a 19 de Setembro.	53
Figura 28 - Resultado de um dos espectros de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco e 1-Out, onde é possível ver a presença de MC-LR a 995,48 m/z.	55
Figura 29 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais do Marco.....	57
Figura 30 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais do Torrão.....	57
Figura 31 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais com vista à optimização do volume de amostragem, do Marco.	58
Figura 32 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais com vista à optimização do volume de amostragem, do Torrão	59

Índice de tabelas

Tabela I – Condições das reacções de PCR para cada par de “primers” utilizados.....	27
Tabela II - Condições da reacção de PCR em tempo real para cada par de “primers”	30
Tabela III - Espécies microscopicamente identificadas nas amostras do Marco e do Torrão em cada uma das datas de amostragem	37
Tabela IV - Resultados da sequenciação para identificação genotípica das estirpes cultivadas, incluindo nº de acesso da base de dados BLAST e percentagem (%) de similaridade	43
Tabela V - Cianobactérias identificadas genotipicamente e microscopicamente	44
Tabela VI - Resultados da análise de PCR para as amostras ambientais.....	46
Tabela VII - Resultados da análise de PCR para optimização do volume de amostragem das amostras ambientais	47
Tabela VIII - Resultados da análise de PCR para as estirpes cultivadas	50
Tabela IX - Resultados da quantificação da toxina por análise de ELISA das estirpes cultivadas em µg de MC-LR equivalentes/L	52
Tabela X - Péptidos identificados através da análise de MALDI-TOF MS	54
Tabela XI - Eficiências e parâmetros da curva padrão da análise de PCR em tempo real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização do volume, para os fragmentos dos genes <i>16S rRNA</i> , <i>16S rRNA</i> específico de <i>Microcystis sp.</i> (m <i>16S rRNA</i>), <i>mcyA</i> e <i>mcyB</i>	56

Índice de abreviaturas

A. flos-aquae – *Aphanizomenon flos-aquae*

Bp – base pairs (pares de bases)

BSA – Bovine Serum Albumin

C. raciborskii – *Cylindrospermopsis raciborskii*

Ct – “Threshold cycle”

CYN – Cilindrospermopsina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISA-AA – Ensaio de ELISA para a amostra ambiental

ELISA-AT – Ensaio de ELISA para a amostra total

ETA – Estação de Tratamento de Águas

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography Diode Array

IARC – International Agency for Research on Cancer

M. aeruginosa – *Microcystis aeruginosa*

M. wesenbergii – *Microcystis wesenbergii*

MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

MC - Microcistina

MC-LR – Microcistina-LR

MS – Mass Spectrometry

NHMRC – Nacional Health and Medical Research Council

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

PCR – Polimerase Chain Reaction

PP1 – Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 1

PP2 – Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 2^a

PSD – Post-Source Decay

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-qPCR – PCR em Tempo Real

UV – Radiação ultravioleta

WHO – World Health Organization

1. Introdução

1.1. Biologia das cianobactérias

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintéticos, gram-negativos (Adams e Duggan 1999; Mankiewicz *et al.* 2003). Contrariamente à maioria dos procariotas, apresentam uma grande diversidade morfológica, fisiológica e metabólica (Adams e Duggan 1999; Dittmann e Wiegand 2006). Morfologicamente compreendem organismos unicelulares, coloniais ou formas filamentosas multicelulares (WHO 1999).

Registos fósseis apontam para a existência de cianobactérias, tanto unicelulares, como filamentosas, há pelo menos 3,5 biliões de anos, tendo sofrido poucas alterações até aos dias de hoje (Adams e Duggan 1999). Assim, estes organismos encontram-se entre os pioneiros da vida na terra, tendo provavelmente sido dos primeiros produtores de matéria orgânica e libertadores de oxigénio para a atmosfera primitiva (WHO 1999). A taxa de evolução extremamente lenta deve-se provavelmente à elevada capacidade de tolerância destes organismos (Adams e Duggan 1999), ocorrendo principalmente em águas superficiais, onde toleram diferenças elevadas de salinidade, temperatura e intensidade luminosa (Funari e Testai 2008). Podem ainda ocorrer em rochas e solos, desertos e regiões vulcânicas (WHO 1999).

Podem formar associações simbióticas com uma grande variedade de organismos como fungos, briófitas, pteridofitas, gimnospérmicas e angiospérmicas (Adams e Duggan 1999; WHO 1999).

São organismos fotoautotróficos, que realizam a fotossíntese de modo semelhante à realizada nos cloroplastos de algas eucarióticas e plantas superiores (Adams e Duggan 1999). O facto de serem organismos fotossintéticos, e devido às suas características morfológicas e ao seu tamanho, inicialmente as cianobactérias foram classificadas como “algas azuis-verdes”. Contudo, quando nos anos 70 se começou a aperceber da sua natureza procariótica, o nome de cianobactéria foi começando a ser mais aceite (Adams e Duggan 1999).

Contrariamente às microalgas eucarióticas, as cianobactérias não possuem organelos subcelulares delimitados por membranas (WHO 1999). Apesar de possuírem um mecanismo de fotossíntese semelhante ao das algas, não possuem cloroplastos (Adams e Duggan 1999; Mankiewicz *et al.* 2003) e os pigmentos fotossintéticos encontram-se nos tilacóides (WHO 1999). Elas contêm clorofila-a, carotenos, xantofilinas, c-fitocianina azul e c-ficocianina vermelha, sendo que as duas últimas são exclusivas das cianobactérias (Mankiewicz *et al.* 2003).

As características das cianobactérias têm dificultado a sua classificação. Inicialmente foram classificadas segundo o Código de Nomenclatura Internacional de Botânica, devido ao facto do principal pigmento fotossintético ser a clorofila-a e de realizarem fotossíntese oxigénica. O aparecimento da microscopia óptica e os testes bioquímicos acabaram por fazer com que estes organismos fossem classificados no reino das bactérias, por serem organismos procariontes, passando a ser regidos pelo Código de Nomenclatura Bacteriológica (WHO 1999; Dittmann e Wiegand 2006).

Um dos processos mais característicos do metabolismo das cianobactérias é a capacidade de fixação de azoto (Mankiewicz *et al.* 2003). Géneros de espécies filamentosas, como *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Nostoc*, podem possuir células especializadas, heterocistos, que permitem a fixação do azoto (WHO 1999). Em condições ambientais de limitação de azoto estas espécies de cianobactérias são favorecidas. Podem igualmente possuir células de resistência a condições ambientais extremas, denominadas de acinetos (Adams e Duggan 1999), tendo ainda a capacidade de armazenar no citoplasma nutrientes essenciais e metabolitos (WHO 1999).

Muitas espécies de cianobactéria apresentam ainda vesículas gasosas. Estas são inclusões citoplasmáticas, que permitem que estes organismos se possam ajustar verticalmente na coluna de água (WHO 1999), posicionando-os na zona eufótica, onde podem realizar a fotossíntese devido à presença de luz, ou atingir camadas mais profundas, ricas em nutrientes (Dittmann e Wiegand 2006). É portanto, um mecanismo de importância ecológica para as espécies planctónicas.

As cianobactérias possuem um metabolismo secundário bastante activo. Metabolitos secundários referem-se aos compostos que não são usados pelo próprio organismo no seu metabolismo primário, ou seja, na divisão celular ou metabolismo, incluindo compostos que actuam como hormonas, antibióticos, aleloquímicos e toxinas (Carmichael 1992; Vasconcelos 2001). Toxinas são metabolitos secundários que têm efeitos adversos noutros tecidos, células ou organismos (Carmichael 1992; Pearson e Neilan 2008). Contudo, nem todas as cianobactérias produzem compostos tóxicos, havendo, no entanto, uma larga dispersão mundial dos géneros potencialmente produtores (Carmichael 1992).

A eutrofização é um processo natural de aumento da produção biológica em ecossistemas aquáticos, sendo o aumento dos níveis de nutrientes, especialmente de compostos de fósforo e azoto, apontados como a principal causa (Vasconcelos 2006). Alguns lagos são naturalmente eutrofizados mas na maioria dos ecossistemas aquáticos, o aumento de nutrientes tem origem antropogénica, resultantes de efluentes industriais e domésticos ou de escoamento de terrenos agrícolas (pesticidas e fertilizantes) (Mankiewicz *et al.* 2003; Vasconcelos 2006). A construção de barragens nos rios tem

igualmente sido apontada como aceleradora do processo de eutrofização (Vasconcelos 2006).

A eutrofização tem causado uma diminuição da qualidade das águas, trazendo sérios problemas para o uso desta, nomeadamente águas para consumo (WHO 1999). O desenvolvimento massivo de macrófitas aquáticas e o aparecimento de florescências de fitoplâncton são sinais deste fenómeno (Vasconcelos 2006). A ocorrência de florescências de fitoplâncton é o fenómeno mais comum em águas eutrofizadas podendo ser responsáveis por danos a nível do ecossistema e da saúde humana. Embora exista uma grande diversidade de grupos de fitoplâncton capazes de formar florescências, os que causam os efeitos mais negativos em termos de diminuição da qualidade das águas são os dinoflagelados, as diatomáceas e as cianobactérias (Vasconcelos 2006).

Florescências de cianobactérias ocorrem intensivamente em águas de superfície eutrofizadas (lagos, albufeiras e rios) (WHO 1999; Mathys e Surholt 2004; Akcaalan *et al.* 2006). O aparecimento das florescências pensa-se ser causada por uma complexa interação entre a concentração de nutrientes, luz solar, temperaturas elevadas, turbidez, pH, condutividade, salinidade, carbono disponível e existência de correntes fracas ou até águas estagnadas (Apeldoorn *et al.* 2007).

Alguns dos efeitos das florescências de cianobactérias são uma diminuição da transparência das águas, elevadas alterações dos níveis de oxigénio e a libertação de toxinas (WHO 1999; Mankiewicz *et al.* 2003; Vasconcelos 2006).

Devido à produção de toxinas pelas cianobactérias, a Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Económica (OECD- Organization for Economic Co-Operation and Development) classificou estes organismos como patogénicos emergentes, ainda que não possuam a capacidade de colonizar ou invadir hospedeiros (OECD 2005).

Embora muitos dos trabalhos de cianobactérias se foquem apenas nos aspectos dos impactos negativos destes organismos nos ecossistemas, têm aumentado o número de trabalhos que mostram que as cianobactérias são capazes de produzir compostos com uma actividade biológica de interesse, podendo ser usados, por exemplo, na indústria farmacêutica (Singh *et al.* 2005). Além do mais, estes organismos são importantes produtores primários, possuindo um papel crucial nos ecossistemas (Codd *et al.* 2005; Dittmann e Wiegand 2006).

1.2. Cianotoxinas

A diminuição da qualidade das águas e o aumento da eutrofização das águas doces traduzem-se numa maior ocorrência e persistência de florescências de cianobactérias (Carmichael 1992). Uma vez que as florescências de cianobactérias são potenciadas por processos de eutrofização, a ocorrência de florescências tóxicas tende a aumentar em tamanho e duração, traduzindo-se numa maior probabilidade de os humanos serem expostos a níveis causadores de toxicidade aguda (Carmichael 1992; Bittencourt-Oliveira 2003).

Segundo Carmichael (1992) as toxinas de cianobactérias são a maior fonte natural de biotoxinas em águas doces superficiais. O aparecimento de florescências tóxicas de cianobactérias é conhecido por todo o mundo, podendo causar efeitos agudos ou crónicos em animais domésticos e selvagens, organismos aquáticos, aves e humanos (Vasconcelos 2001; Codd *et al.* 2005; Sangolkar *et al.* 2006; Apeldoorn *et al.* 2007).

O problema causado por cianotoxinas e o aparecimento de florescências começou a ser tido em atenção através de documentações de intoxicações animais, sendo que o primeiro caso verdadeiramente documentado remonta a 1878, na Austrália, onde foi descrito o envenenamento de gado após o consumo de água de um lago contaminado por cianobactérias (WHO 1999). Após este estudo, vários trabalhos começaram a surgir focando o potencial tóxico das cianobactérias, sendo que a evolução e descoberta de novas toxinas continua a acontecer. Hoje, mais de 84 variantes de cianotoxinas estão descritas, embora apenas uma pequena fracção delas esteja bem documentada (WHO 1999) (mudar a referência). Os efeitos das cianotoxinas nos animais não são os únicos reportados. Contudo, até à data ainda não foi reportado nenhum caso de morte humana por ingestão de cianotoxinas. O caso mais grave, envolvendo humanos, ficou conhecido como o “síndrome de Caruaru”, tendo ocorrido na cidade de Caruaru, no Brasil (Azevedo *et al.* 2002). Neste incidente, mais de 60 pessoas morreram após uma sessão de hemodiálise, realizada com águas não devidamente tratadas de um reservatório eutrofizado (Azevedo *et al.* 2002).

Estima-se que mais de 40 géneros diferentes de cianobactérias seja produtores de toxinas contudo, os géneros mais importantes são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) (Vasconcelos 2001; Apeldoorn *et al.* 2007). Cada cianotoxina pode ser produzida por mais do que uma espécie e, dentro da mesma espécie de cianobactéria, podem ser produzidas diferentes toxinas (WHO 1999; Funari e Testai 2008).

A contaminação por cianotoxinas em humanos pode ocorrer por ingestão, inalação, contacto dérmico e por modo intravenoso (Vasconcelos 2001). Para além do problema

directo de contaminação das águas superficiais, as cianotoxinas podem-se acumular ao longo da cadeia trófica, produzindo diversos sintomas de intoxicação e efeitos crónicos, os quais são difíceis de diagnosticar e prevenir, já tendo sido reportados vários casos de elevadas mortalidades de peixes e animais domésticos (Bittencourt-Oliveira 2003).

Os compostos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são quimicamente diversos, podendo a classificação dos diferentes tipos de toxinas se basear nos seus efeitos nos organismos afectados. Segundo esta classificação, existem 5 classes de toxinas produzidas pelas cianobactérias de água doce: hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina), citotoxinas (cilindrospermopsina), dermatoxinas (Mankiewicz *et al.* 2003; Dittmann e Wiegand 2006; Sangolkar *et al.* 2006). A quinta classe refere-se aos lipopolissacarídeos (LPS), os quais possuem diversos efeitos adversos nos organismos afectados (Mankiewicz *et al.* 2003; Dittmann e Wiegand 2006; Sangolkar *et al.* 2006).

Estas toxinas, nos ecossistemas aquáticos encontram-se na sua maioria no interior das células, sendo libertados quando ocorre a lise celular (Mankiewicz *et al.* 2003; Sangolkar *et al.* 2006; Funari e Testai 2008), embora também possa ocorrer libertação activa da toxina durante o crescimento celular (WHO 1999; Sangolkar *et al.* 2006; Funari e Testai 2008). O aparecimento de estirpes tóxicas e não tóxicas de cianobactérias não é possível de prever, além de que diferentes estirpes de uma mesma espécie podem não ser tóxicas ou produzir diferentes toxinas (Sangolkar *et al.* 2006; Apeldoorn *et al.* 2007). Outros dos problemas que se levantam reside no facto de que os químicos usados para controlar e erradicar as florescências de cianobactérias contribuem para a libertação da toxina, como é o caso de alguns algicidas (Sangolkar *et al.* 2006; Funari e Testai 2008). Uma vez libertadas na água, a persistência das toxinas no ambiente vai depender da eficiência de degradação (fotólise, hidrólise e degradação bacteriana) (Funari e Testai 2008).

De todas as cianotoxinas até à data encontradas, as hepatotoxinas, como as microcistinas, são as que ocorrem com maior frequência, tanto a nível mundial, como a nível de Portugal (Martins *et al.* 2009). A cilindrospermopsina ainda não foi detectada em Portugal mas, a principal espécie produtora, *Cilindrospermopsis raciborskii* tem sido identificada, estando actualmente classificada como uma espécie invasora (Saker *et al.* 2003). Assim, as toxinas pesquisadas no presente trabalho incluíram hepatotoxinas e citotoxinas, seguindo-se um resumo sobre estas.

1.2.1. Hepatotoxinas: microcistinas e nodularinas

As hepatotoxinas são péptidos cíclicos, compreendendo as microcistinas e as nodularinas (Vasconcelos 2001; Bittencourt-Oliveira 2003; Funari e Testai 2008).

As microcistinas diferem das nodularinas no conteúdo de aminoácidos. Ambos contêm um aminoácido hidrofóbico único, ADDA, apenas presente neste tipo de toxinas, o qual é indispensável para a actividade biológica destas moléculas, pelo que, qualquer alteração a nível da cadeia deste aminoácido, conduz a uma redução da toxicidade das hepatotoxinas (WHO 1999; Vasconcelos 2001; Mankiewicz *et al.* 2003; Dittmann e Wiegand 2006; Msagati *et al.* 2006).

As microcistinas constituem um dos principais grupos de cianotoxinas devido à sua ocorrência mundial e elevada toxicidade, sendo a cianotoxina que mundialmente é mais reportada (WHO 1999; Apeldoorn *et al.* 2007). Podem ser produzidas por inúmeros géneros, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix (Oscillatoria)*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Anabaenopsis*, entre outros (Akcaalan *et al.* 2006; Sangolkar *et al.* 2006). O nome destas hepatotoxinas deriva da primeira espécie de cianobactéria em que a toxina foi detectada, *Microcystis aeruginosa* (Carmichael 1992). São um grupo de heptapeptidos cíclicos (D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha) compostos por aminoácidos comuns como alanina, arginina, triptofano, leucina, e um aminoácido especial, o ADDA. (Vasconcelos 2001; Sangolkar *et al.* 2006). Existem cerca de 70 isoformas diferentes (Rücker *et al.* 2007) até à data identificadas, com diversos níveis de toxicidade (Bittencourt-Oliveira 2003; Akcaalan *et al.* 2006). As variantes de microcistina são formadas por substituição dos locais dos aminoácidos, por metilação ou desmetilação da molécula, por variações a nível da estrutura da cadeia ADDA, ou por modificações no ácido D-glutâmico, inferindo estas variações na toxicidade (Mankiewicz *et al.* 2003; Sangolkar *et al.* 2006). Na figura 1 encontra-se a estrutura química da microcistina-LR, a variante mais comum de microcistina, caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R), nas posições 2 e 4 da molécula (Funari e Testai 2008).

As nodularinas têm uma estrutura similar às microcistinas, diferindo no número de aminoácidos (Vasconcelos 2001). São constituídas por 5 aminoácidos, já tendo sido isoladas 7 variantes, todas elas na espécie *Nodularia spumigena* (Mankiewicz *et al.* 2003; Akcaalan *et al.* 2006). Na figura 2 encontra-se representada a estrutura química de uma nodularina.

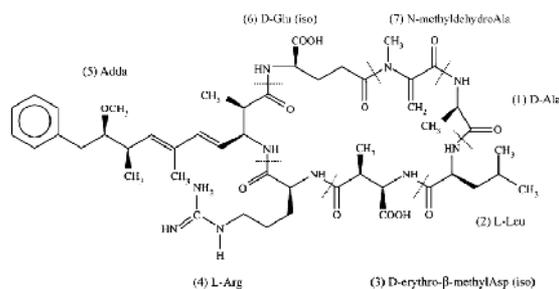


Figura 1 - Estrutura química da microcistina-LR, caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R) como L-aminoácidos nas posições 2 e 4 (Funari e Testai 2008).

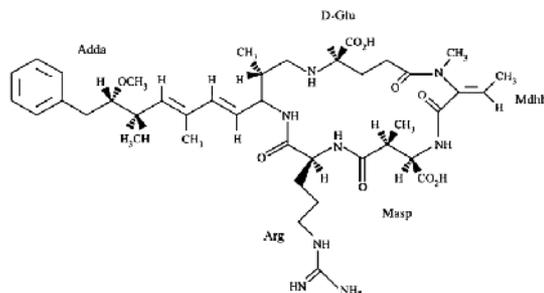


Figura 2 - Estrutura química de uma nodularina (Funari e Testai 2008).

A actividade biológica de microcistinas e nodularinas é semelhante. As hepatotoxinas causam disrupção do fígado, por aumento do volume deste e choque hipovolémico (hepatomegalia) (Mankiewicz *et al.* 2003).

As vias de intoxicação podem ser por ingestão, inalação ou absorção cutânea (Mankiewicz *et al.* 2003). As hepatotoxinas são resistentes à digestão sendo posteriormente transportadas para o fígado. Uma vez que são solúveis em água, não conseguem penetrar as membranas lipídicas directamente (WHO 1999). Assim, o hepatotropismo das microcistinas faz-se através de transportadores de membrana, como o sistema de transporte do ácido biliar, levando à inibição nos eucarióticos de proteínas fosfatases enzimáticas específicas, tipo 1 ou 2A (PP1 ou PP2), ligando-se covalentemente a estas, nas células do fígado. Estas são importantes componentes na manutenção da estrutura e função celular (Vasconcelos 2001). Assim, a ligação das microcistinas a proteínas fosfatases provoca um aumento da fosforilação de várias proteínas citosólicas e do citosqueleto envolvidas na transdução de sinais (Mankiewicz *et al.* 2003; Funari e Testai 2008). A níveis elevados de exposição os hepatócitos perdem volume, conduzindo a hemorragia hepática (Vasconcelos 2001). O sangue vai progressivamente ocupando os espaços entre as células (hemorragia intra-hepática), levando à morte por choque hipovolémico (Vasconcelos 2001; Dittmann e Wiegand 2006).

A inibição das proteínas fosfatase por hepatotoxinas quebra o balanço natural dos processos celulares, resultando em proliferação celular e promoção de tumores, ou

apoptose e morte celular (Vasconcelos 2001; Mankiewicz *et al.* 2003; Dittmann e Wiegand 2006).

A severidade da toxicidade induzida por hepatotoxinas vai depender dos níveis e duração da exposição, que influenciam a quantidade de toxina absorvida, destoxificada e excretada (Mankiewicz *et al.* 2003; Funari e Testai 2008), podendo ocorrer efeitos crónicos ou agudos (Sangolkar *et al.* 2006)

Segundo Funari e Testai (2008), a agência internacional para estudos do cancro (IARC – International Agency for Research on Cancer) classificou, com base nos trabalhos relativos à promoção de tumores pelas microcistinas, a microcistina-LR como possível carcinogénico para humanos (grupo 2B).

Para além dos hepatócitos, as hepatotoxinas podem afectar outras células. A inibição da actividade PP1 e PP2 pode ocorrer em qualquer célula eucariótica, embora necessite de transportadores para atravessar as membranas celulares (Mankiewicz *et al.* 2003).

Estas toxinas têm igualmente a capacidade de se bioacumular ao longo da cadeia trófica, normalmente causando efeitos crónicos, resultando num problema acrescido de saúde pública (Dietrich e Hoeger 2005; Apeldoorn *et al.* 2007). Existem numerosos trabalhos que reportam ainda a acumulação de microcistinas em organismos aquáticos, assim como em vegetais irrigados por água contaminada (Apeldoorn *et al.* 2007). Nos últimos anos, têm também começado a surgir estudos sobre a exposição involuntária, em humanos, a microcistinas através de suplementos alimentares (Saker *et al.* 2007b)

O valor guia de microcistina-LR (MC-LR) em águas para consumo foi introduzida pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (WHO 1999), com um limite recomendado de 1µg de MC-LR por litro. O mesmo valor foi transposto para a legislação portuguesa, através do decreto-lei 306/2007 de 27 de Agosto.

1.2.2. Citotoxinas: cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYN) é um alcalóide que possui uma guanina cíclica ligada ao grupo hidroximetiluracil (figura 3), sendo produzida por várias espécies como *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Anabaena bergeii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata*, e *Lyngbya wollei* (Falconer e Humpage 2006; Apeldoorn *et al.* 2007).

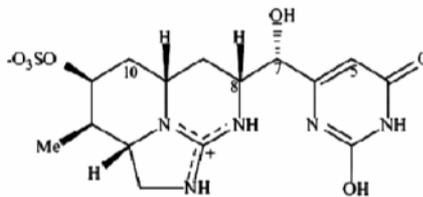


Figura 3 - Estrutura química da cilindrospermopsina (Funari e Testai 2008).

A cilindrospermopsina foi descrita inicialmente como uma toxina produzida pela espécie *C. raciborskii*, uma cianobactéria tropical e subtropical. Contudo, esta cianobactéria tem vindo a ser reportada em latitudes mais temperadas, tendo-se tornado uma espécie comum em habitats de águas temperadas por todo o mundo (WHO 1999; Saker *et al.* 2003; Falconer e Humpage 2006). Recentemente, tem sido detectada a presença da cianotoxina em florescências e culturas de *C. raciborskii* da Europa (Bláhová *et al.* 2009; Kokocinski *et al.* 2009). Desde 2003 que a espécie *C. raciborskii* tem sido isolada em diversos locais do centro e sul de Portugal (Saker *et al.* 2003; Valério *et al.* 2005).

De acordo com Gácsi e colaboradores (2009), a cilindrospermopsina está classificada como uma toxina de elevada prioridade, podendo inclusive ser mais perigosa que a microcistina. Devido à inexistência de um valor guia para esta cianotoxina, Humpage e Falconer (2003), propuseram um limite de 1µg/L de CYN total, em águas para consumo. Ao contrário de outras cianotoxinas, CYN encontra-se sobretudo na forma dissolvida, pelo que a ingestão directa pela água pode ser uma importante via de contaminação (Ibelings e Chorus 2007; Funari e Testai 2008).

O primeiro caso reportado de intoxicação humana ocorreu em Palm Island, Australia, em 1979. Os efeitos tóxicos observados nos humanos eram consistentes com os reportados em estudos de toxicidade em animais (Falconer e Humpage 2006). Na mesma altura foi observada a morte de gado, induzida pela cilindrospermopsina, após a ingestão de água de uma albufeira contaminada (Saker *et al.* 1999).

Esta cianotoxina encontra-se classificada como sendo uma citotoxina que bloqueia a síntese proteica, sendo os órgãos alvo primários o fígado e o pâncreas; contudo, afectam igualmente os rins, pulmões, coração, estômago e glândulas adrenais (Funari e Testai 2008; Smith *et al.* 2008). Os primeiros sinais clínicos de intoxicação são falência hepática e renal (Mankiewicz *et al.* 2003).

O mecanismo celular envolvido na toxicidade desta cianotoxinas é ainda desconhecido (Smith *et al.* 2008). Tem sido reportada como causadora de necrose celular, fragmentação do DNA e iniciadora de tumores ou mutagenicidade (Apeldoorn *et al.* 2007). Vários estudos têm demonstrado que a cilindrospermopsina não reage

directamente com o DNA, mas que causa alterações a nível do citosqueleto e do núcleo, bem como potencia a necrose e a apoptose (Fessard e Bernard 2003; Gácsi *et al.* 2009). Humpage e colaboradores (2000), sugeriram que os danos induzidos pela cilindrospermopsina provocam quebras nas cadeias de DNA e perda de cromossomas (aneuploidia), tendo já sido observada a produção de aductos e quebras nas cadeias de DNA por Shen e colaboradores (2002). Estudos apontam igualmente para a possibilidade da cilindrospermopsina ser promotora de tumores (Falconer e Humpage 2001). Estudos recentes demonstram igualmente uma acção da cianotoxina como disruptora endócrina (Young *et al.* 2008).

Froschio e colaboradores (2003) e Norris e colaboradores (2002) concluíram que para ocorrer citotoxicidade é necessário que ocorra biotransformação pelo citocromo P450.

Vários estudos têm sido reportados em organismos aquáticos e invertebrados, com o objectivo de compreender melhor o mecanismo de acção da toxina (Saker e Eaglesham 1999; Metcalf *et al.* 2002; Nogueira *et al.* 2004; Saker *et al.* 2004; Kinneer *et al.* 2007; White *et al.* 2007). Estes estudos apontam para uma capacidade de acumulação da toxina em organismos aquáticos, mesmo após períodos de depuração, apresentando assim um risco acrescido para a população humana.

1.3. Ocorrência de cianobactérias e suas toxinas em Portugal

Portugal é um país localizado numa zona temperada onde têm sido reportados inúmeros casos de florescências de cianobactérias tóxicas em rios e albufeiras (Vasconcelos 1994; Vasconcelos 1995; Vasconcelos *et al.* 1996; Vasconcelos 2001). É ainda de referir que muitos dos cursos de água do país se encontram eutrofizados, o que potencia o aparecimento das florescências. Acresce ainda a este problema, o facto de que muitos destes cursos de água são utilizados para produção de água para consumo (Vasconcelos *et al.* 1996), pondo em risco a saúde pública.

Vasconcelos (1994) investigou a presença de cianobactérias, e toxicidade associada em 36 lagos, albufeiras e grandes rios de Portugal, durante o período de 1989-92. Destas 36 massas de água, 30 apresentaram florescências de cianobactérias, das quais 60% revelaram-se tóxicas através de bioensaios com murganhos. De acordo com este estudo, constatou-se que a espécie *M. aeruginosa* era a espécie dominante de cianobactéria, seguindo-se as espécies *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *M. wesenbergii* (Vasconcelos 1994). Saker *et al.* (2007a), num estudo feito em 26 reservatórios de água naturais do norte e centro de Portugal determinou que em 81% dos casos ocorria a presença do género *Microcystis*, sendo que a maioria destes locais apresentou resultados positivos de microcistina.

Em Portugal, as microcistinas são o tipo de cianotoxinas com maior ocorrência (Vasconcelos 2001). Dentro destas, a microcistina-LR é a toxina dominante de florescências e de estirpes isoladas e caracterizadas em laboratório, embora também ocorram microcistinas-RR e microcistinas-YR (Vasconcelos *et al.* 1996; Vasconcelos 2001; Saker *et al.* 2005a). Martins e colaboradores (2009) detectaram em amostras de albufeiras, rios e lagos do norte e centro de Portugal diversas variantes de microcistinas, sendo as mais comuns microcistina-LR, -FR, -RR, -WR e -YR. Já foram até à presente data reportadas 13 variantes diferentes de microcistinas no país (Vasconcelos 2006).

Desde 2003 que a espécie *C. raciborskii* tem sido isolada em diversos locais do centro e sul de Portugal (Saker *et al.* 2003; Valério *et al.* 2005). Análise toxicológica das estirpes isoladas por Saker e colaboradores (2003) verificou toxicidade letal em bioensaios com ratos contudo, a cilindrospermopsina não foi identificada, podendo ser que outras toxinas, com acção similar, possam estar envolvidas.

Não existem casos reportados de intoxicações em humanos que demonstrem ter sido provocados por cianotoxinas, muito em parte por falta de informação da população em geral. Até porque em muitos casos as cianobactérias podem desaparecer antes de se poder fazer uma relação causa-efeito, ou podem até nem chegar a formar florescências.

1.4. Metodologias para identificação de cianobactérias e suas toxinas

Até recentemente, a identificação de cianobactérias assentava em métodos taxonómicos tradicionais para análise de fitoplâncton, normalmente baseada em características morfológicas. Contudo, estes métodos nem sempre têm sido suficientes, principalmente porque muitas estirpes, quando em cultura, podem alterar as dimensões, forma ou características das colónias (Neilan 2002; Vasconcelos 2006). A informação obtida por análise microscópica pode, no entanto, ser importante para determinação de qual a melhor metodologia a usar (Apeldoorn *et al.* 2007).

A incapacidade de prever a produção de toxinas das florescências de cianobactérias sem recorrer a isolamento e determinação da produção da toxina dificulta a monitorização das águas. Estirpes tóxicas e não-tóxicas não apresentam diferenças predictíveis no seu aparecimento, e diferentes estirpes de uma mesma espécie podem ser ou não tóxicas, podendo ainda produzir diferentes toxinas (Sangolkar *et al.* 2006). O nível da toxina produzida vai depender do estado da florescência e das espécies e estirpes envolvidas, o que impossibilita o exame microscópico para determinar a produção da toxina (Sangolkar *et al.* 2006).

Até ao desenvolvimento de técnicas e métodos de detecção analíticos e moleculares, devido à inexistência de uma relação entre características fisiológicas e morfológicas com

a produção de toxina, era complicada a determinação, uma vez que se baseava apenas em bioensaios com animais (bactérias, invertebrados e ratos) (Pearson e Neilan 2008). Estes métodos têm como principal desvantagem não permitir a determinação de baixas concentrações de cianotoxinas (WHO 1999; Masango *et al.* 2008), além de que são poucos sensíveis, de custos elevados e acarretam diversos problemas éticos (Pearson e Neilan 2008).

O desenvolvimento de métodos analíticos fiáveis para a monitorização de toxinas de cianobactérias, como as microcistinas, em amostras ambientais, tem sido alvo de inúmeros estudos. A determinação de microcistinas pode ser feita recorrendo a técnicas analíticas como o HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) e espectrometria de massa (mass spectrometry – MS) (Sangolkar *et al.* 2006). O método de HPLC é o mais utilizado para detecção de microcistinas, em monitorizações de rotina (WHO 1999). Este método, assim como o método de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) são bastante sensíveis contudo, são técnicas morosas, tecnicamente exigentes (Sangolkar *et al.* 2006). O HPLC, combinado com detecção UV permite providenciar uma informação quantitativa e qualitativa contudo, para tal necessita de padrões de toxina purificada, a qual é por vezes difícil de obter, além de necessitar de grandes volumes de amostra quando a toxina se encontra em baixas concentrações e de passos adicionais para purificação das amostras (Rivasseau *et al.* 1999; Rapala *et al.* 2002; Mathys e Surholt 2004; Sangolkar *et al.* 2006; Pearson e Neilan 2008). A grande vantagem do MALDI-TOF MS, quando comparado com outras técnicas analíticas é que permite uma completa análise de pequenas amostras, sem necessidade de se fazer uma pré-purificação (Sangolkar *et al.* 2006; Apeldoorn *et al.* 2007).

Outra das metodologias usadas baseia-se no uso de ensaios imunológicos com anticorpos mono ou policlonais (Sangolkar *et al.* 2006). O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é rápido, de baixo custo, requer pouca quantidade de amostra (Rivasseau *et al.* 1999; Mathys e Surholt 2004; Sangolkar *et al.* 2006), sendo ainda capaz de detectar quantidades dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Quando comparado com técnicas analíticas, como o HPLC, tem como principal vantagem ter um menor limite de detecção (Metcalf e Codd 2003). Apesar destas vantagens, a elevada variação estrutural que ocorre, por exemplo, entre as microcistinas, pode levar a reacções cruzadas entre os anticorpos com diferentes variantes da toxina ou com outros compostos que possam estar presentes nas amostras, podendo estas reacções não exprimirem correctamente valores de concentração da toxina (Rapala *et al.* 2002;

Sangolkar *et al.* 2006), além de que este teste não providencia informação sobre as variantes de microcistinas presentes (Masango *et al.* 2008).

A necessidade de novas técnicas, possíveis de ser aplicadas tanto a amostras ambientais, como a culturas de laboratório, levou ao desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de espécies de cianobactérias (Neilan *et al.* 1997; Saker *et al.* 2005b).

Muitos dos estudos para detecção de cianotoxinas baseiam-se em técnicas como ELISA e HLPC. Este tipo de técnicas são úteis para identificar concentrações de cianotoxinas potencialmente perigosas contudo, não providenciam informação referente à origem do contaminante. O uso de técnicas como o da reacção em cadeia de polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction) permite identificar os organismos que estão a provocar a contaminação.

O uso da técnica de PCR é cada vez mais comum, até porque é simples de executar, rápida, de baixo custo e extremamente sensível (Pearson e Neilan 2008).

Quando o objectivo é a detecção de espécies potencialmente tóxicas, em PCR deve-se procurar genes indispensáveis para a produção da toxina. É necessário ter ainda em conta que estes genes devem ser conservados no grupo de cianobactérias alvo, mas divergentes de uma maior grupo de cianobactérias (Pearson e Neilan 2008).

As microcistinas e nodularinas são produzidas não ribossomalmente, por um complexo multienzimático constituído por unidades péptido sintetase (NRPS) e poliquetidos sintetase (PKS), todos codificados por um cluster de genes da microcistina sintetase (*mcy*) e nodularina sintetase (*nda*) (Sangolkar *et al.* 2006; Pearson e Neilan 2008). Estes clusters têm vindo a ser sequenciados e caracterizados num grande número de espécies (Pearson e Neilan 2008). A descoberta de sequências de genes responsáveis pela produção das mais comuns cianotoxinas foi um enorme passo dado nesta área. Hoje em dia, apenas com uma colónia é possível obter informações sobre a presença de clusters de genes envolvidos na produção das toxinas.

A sequenciação do DNA permitiu que se conhecesse a codificação dos genes *mcy* em três dos maiores produtores, *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix* (Sangolkar *et al.* 2006). Estudos comparativos de clusters de genes *mcy* de diferentes espécies pertencentes a diferentes géneros mostraram a existência de variação no arranjo dos genes, embora se pense que o processo biossintético de produção de toxina se mantenha igual (Pearson e Neilan 2008).

Os genes *mcy*, em *M. aeruginosa* estão organizados num cluster com dois operões, contendo, no total, 10 genes (*mcy A-C* e *mcy D-J*) (Ouahid *et al.* 2005; Sangolkar *et al.* 2006; Pearson e Neilan 2008). Um operão inclui genes codificantes NRPS (*mcyA*, *mcyB*

e *mcyC*) e o outro operão contém um gene codificante PKS (*mcyD*), dois genes híbridos codificantes NRPS e PKS (*mcyE* e *mcyG*) e ainda genes codificantes de enzimas envolvidas na metilação (*mcy J*), epimerização (*mcy F*), desidratação (*mcy I*) e localização (*mcy H*) (Ouahid *et al.* 2005; Sangolkar *et al.* 2006; Pearson e Neilan 2008). A sequenciação destes genes permitiu o desenho de “primers” (iniciadores), permitindo a detecção e identificação de espécies potencialmente produtoras de toxinas em amostras naturais, mesmo quando estas surgem em quantidades muito pequenas (Sangolkar *et al.* 2006). Estudos têm comprovado que o “primers” relativos a genes *mcy* são mais fiáveis para distinguir espécies produtoras ou não de microcistinas, quando comparado com outros “primers” de genes diferentes (Sangolkar *et al.* 2006).

Genes codificantes NRPS, como o *mcyA* e o *mcyB* têm sido os alvos mais utilizados para a detecção de genótipos hepatotóxicos. Saker e colaboradores (2007b), com vista a facilitar e diminuir o tempo de realização de várias análises de PCR, desenvolveram um “multiplex” PCR para a determinação, numa só reacção dos genes *mcyA*, *mcyB* e permitindo ainda verificar a presença do género *Microcystis*. O gene *mcyE* tem sido cada vez mais usado como alvo, uma vez que é essencial para a síntese da cadeia ADDA e a activação e adição do D-glutamato à molécula de microcistina (Ouahid *et al.* 2005). Estes dois aminoácidos são essenciais para a toxicidade e sofrem menos variações nas diferentes isoformas, que os outros aminoácidos (Pearson e Neilan 2008).

O cluster de cilindropermopsina contém 15 regiões de leitura que codificam enzimas para todas as funções necessárias para a biossíntese, regulação e exportação desta toxina, incluindo uma amidinotransferase (*CyrA*), uma mistura NRPS/PKS (*CyrB*), quatro módulos PKS (*CyrC-F*), duas citosinas diaminases homólogas (*CyrG* e *H*), uma hidroxilase (*CyrI*), uma bomba de fluxo (*CyrK*) e uma transposase (*CyrL*).

Schembri e colaboradores (2001) sugeriram que tanto os PKS como os NRPS estavam envolvidos na produção de cilindropermopsina, demonstrando que em *C. raciborskii* existe uma relação directa entre a presença destes dois péptidos e a capacidade de produzir a toxina. Assim, Fergusson e Saint (2003) desenvolveram uma análise de PCR em “multiplex” com o objectivo de determinar a presença dos genes codificantes PKS, NRPS e ainda uma parte do gene *rpoC1*, específica da cianobactéria *C. raciborskii*, permitindo identificar cianobactérias produtoras de cilindropermopsina, ao mesmo tempo que diferencia se a produção é feita pela espécie *C. raciborskii*.

Vários estudos moleculares demonstram que certas estirpes de cianobactérias com a presença de genes envolvidos na biossíntese das toxinas, podem não ser tóxicas. O motivo pelo qual não ocorre a síntese da toxina é ainda incerto. Estes resultados apontam para que uma análise molecular apenas assente no carácter toxigénico pode levar a conclusões não correctas (Pearson e Neilan 2008). Assim, principalmente quando

este tipo de testes é utilizado em amostras naturais, uma abordagem multidisciplinar demonstra ser a mais correcta.

A quantificação potencial da produção de toxina é possível recorrendo ao PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (Sangolkar *et al.* 2006). Esta análise é bastante sensível, permitindo resultados fiáveis com apenas algumas células por reacção (Pearson e Neilan 2008). Este método tem sido utilizado tanto para a detecção de cianobactérias, como também para detecção de genes *mcy*, assim como genes envolvidos na produção de cilindrospermopsina (Kurmayer e Kutzenberger 2003; Rinta-Kanto *et al.* 2005). Esta metodologia pode ter grandes vantagens, essencialmente quando aplicada a amostras ambientais, uma vez que permite distinguir nas comunidades ambientais espécies dominantes dos ecossistemas e que possam ser mais problemáticas (Pearson e Neilan 2008).

1.5. Objectivos

No presente trabalho foram utilizadas técnicas de microscopia para identificar as principais espécies presentes; técnicas moleculares de PCR para identificar a presença de genes de cianobactérias, de espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e envolvidos na produção das toxinas, e de PCR em tempo real para quantificar a quantidade de cianobactérias e de espécies potencialmente produtoras de toxina; ensaios imunológicos (ELISA) para quantificação da toxina (microcistina e cilindrospermopsina); ensaios cromatográficos (HPLC) para quantificação de microcistina, assim como análises de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) para detectar as diferentes variantes de toxinas nas amostras.

São objectivos específicos deste trabalho, os seguintes:

- Pesquisa, identificação, isolamento e cultura de cianobactérias no rio Tâmega, na albufeira do Torrão, utilizando microscopia óptica e técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciação);
- Optimização dos volumes de amostragem, utilizando técnicas de biologia molecular (PCR e RT-qPCR) e técnicas imunológicas (ELISA);
- Pesquisa de genes para identificação de cianobactérias (fragmento do *16S rRNA* específico de cianobactérias), de espécies potencialmente produtoras de cianotoxinas (fragmento do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis spp.* e fragmento do gene *rpoC1*, específico de *Cylindrospermopsis raciborskii*) e de genes envolvidos na produção das toxinas nas amostras ambientais e nas estirpes cultivadas com técnicas de biologia molecular (PCR e RT-qPCR);
- Detecção e/ou quantificação das toxinas presentes nas amostras ambientais e nas estirpes cultivadas por técnicas cromatográficas (HPLC), imunológicas (ELISA), e de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo

O presente trabalho foi efectuado em dois locais pertencentes à albufeira do Torrão, no Rio Tâmega, um na região da cidade de Marco de Canaveses (N- 41,19562°; W- 8,16045°) e um segundo junto à barragem hidroeléctrica do Torrão (N- 41,09698°; W- 8,25737°). Os locais foram seleccionados tendo em conta a importância destes para as populações locais, a importância do Rio Tâmega em relação ao Rio Douro, e trabalhos anteriores (Vasconcelos 1994; Vasconcelos 1995; Vasconcelos *et al.* 1995; Vasconcelos *et al.* 1996; Pereira 1998; Saker *et al.* 2005a; Martins 2007; Saker *et al.* 2007a; Oliva-Teles *et al.* 2008).

2.1.1. Caracterização dos locais de amostragem

O Rio Tâmega é o maior e mais comprido afluente do Rio Douro no território nacional. A margem da bacia hidrográfica do Rio Tâmega é constituída por terrenos essencialmente agrícolas. Em 1988 foi construída no leito do rio, uma barragem hidroeléctrica, levando à formação, a montante, da albufeira do Torrão (Martins 2007). Devido à construção de barragens ao longo do rio, os ecossistemas têm vindo a ser alterados, surgindo essencialmente ecossistemas lóticos, os quais alternam com ecossistemas lênticos e semi-lênticos (Martins 2007).

O rio encontra-se eutrofizado desde a cidade de Chaves, podendo a albufeira do Torrão piorar esta situação, caso não tenha uma gestão adequada (Pereira 1998). O facto de nas margens se fazer uma actividade essencialmente agrícola, aliada aos efluentes urbanos de zonas como a cidade do Marco de Canaveses, propiciam o aumento da eutrofização.

A albufeira do Torrão é uma importante fonte de água para consumo e recreativa do norte de Portugal. É comum o aparecimento de florescências tóxicas de ciabactérias, dominadas pelas espécies *M. aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Oliva-Teles *et al.* 2008). O aparecimento das florescências ocorre essencialmente nos meses quentes, uma vez que possuem uma taxa de crescimento muito dependente da temperatura (Oliva-Teles *et al.* 2008). Segundo Oliva-Teles e colaboradores (2008), o aparecimento das florescências nesta albufeira tem sido atribuído à eutrofização, em combinação com a construção da barragem a jusante.

Na albufeira do Torrão foram seleccionados dois pontos de amostragem (fig.4). O primeiro local de amostragem situa-se no Marco de Canaveses (fig.5), próximo da ETA (estação de tratamento de águas). O segundo local foi seleccionado mesmo junto à barragem (fig.6), com o objectivo de se determinar se a contaminação encontrada no local anterior se mantém ou é alterada. Este local possui uma grande importância, até porque já se situa muito próxima do rio Douro.

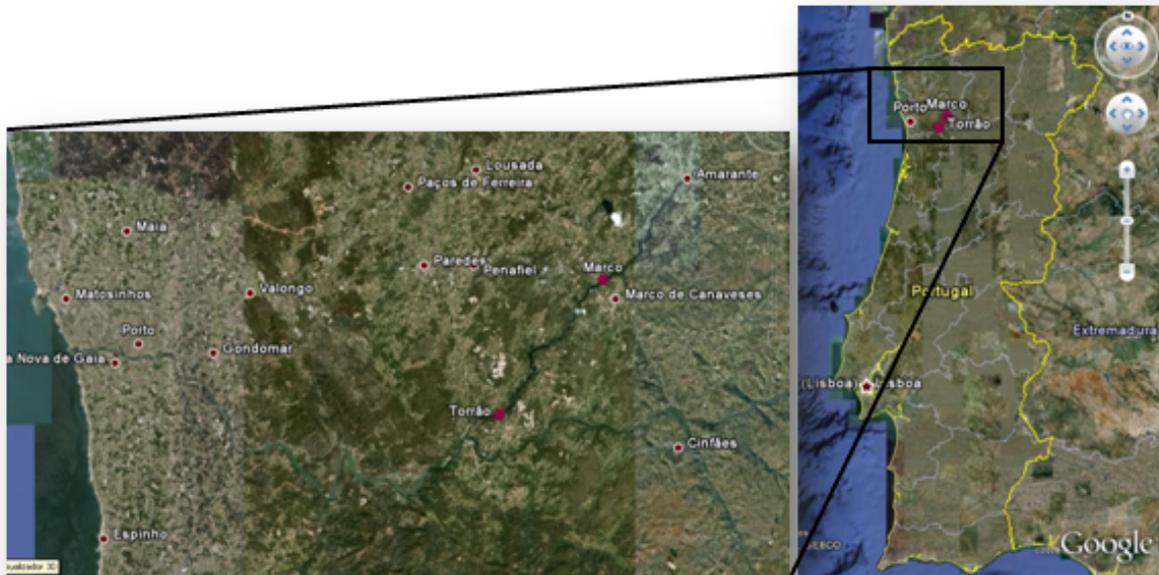


Figura 4 - Locais de amostragem (imagem obtida através do software Google Earth 5.0.11733.9347).



Figura 5 - Albufeira do Torrão. Local de amostragem: Marco.



Figura 6 - Albufeira do Torrão. Local de amostragem: Torrão.

Segundo Martins (2007), estes locais de amostragem possuem características semi-lênticas, com uma acentuada diminuição da corrente. Ainda segundo a referida autora, esta albufeira encontra-se hipereutrofizada, sendo comum o aparecimento de florescências fitoplanctónicas entre o verão e até meados de Outubro. Junto à cidade do

Marco de Canaveses, foi igualmente inaugurado, em Dezembro de 2008, um parque fluvial, atraindo para este local pessoas que acabam por utilizar estas águas igualmente para fins recreativos.

2.2. Amostragem de cianobactérias

As amostragens foram realizadas com intervalos de aproximadamente 15 dias, num total de quatro amostragens, entre Setembro e Outubro de 2008 (19 de Setembro, 1, 15 e 29 de Outubro). Este período foi escolhido tendo em consideração resultados anteriores (Vasconcelos 1994; Martins *et al.* 2005; Vale 2005)

No local de amostragem procedeu-se igualmente à determinação de parâmetros físico-químicos. A temperatura e concentração de oxigénio foram determinados recorrendo a um oxímetro (OXI 320/Set/WTW) e o pH e condutividade, obtidos por um leitor de pH (Multiline P3pH/LF-Set/WTW).

Em cada uma das datas foram recolhidos diferentes volumes de amostra, com o objectivo de efectuar diferentes ensaios laboratoriais. Em frascos com volumes entre 250 a 2000 mL (conforme o estado de turvação da água devida às cianobactérias) foram recolhidas amostras para análise molecular, e 2000 mL para análise cromatográfica (HPLC). Para análise imunológica (ELISA) foram amostrados 15 mL. Para posterior isolamento das cianobactérias, foram efectuados vários arrastos, com uma rede cónica de plâncton de malha de 50 µm, para concentração destes organismos.

Em 19 de Setembro e 1 de Outubro foram recolhidos diferentes volumes de amostra (entre os 15 e os 1000 mL), com vista à optimização do volume amostrado para análise de PCR e RT-qPCR. Nas duas últimas datas (15 e 29 de Setembro) foram igualmente recolhidos diferentes volumes para optimização de volume amostrado para realizar o teste de ELISA.

Todas as recolhas de água foram feitas na margem, subsuperficialmente, tendo-se posteriormente transportado as amostras em malas térmicas e acondicionadas a 4°C até posterior análise. O tratamento das amostras no laboratório nunca excedeu as 48 horas.

O esquema de amostragem e todo o resumo da metodologia encontra-se na fig 7.

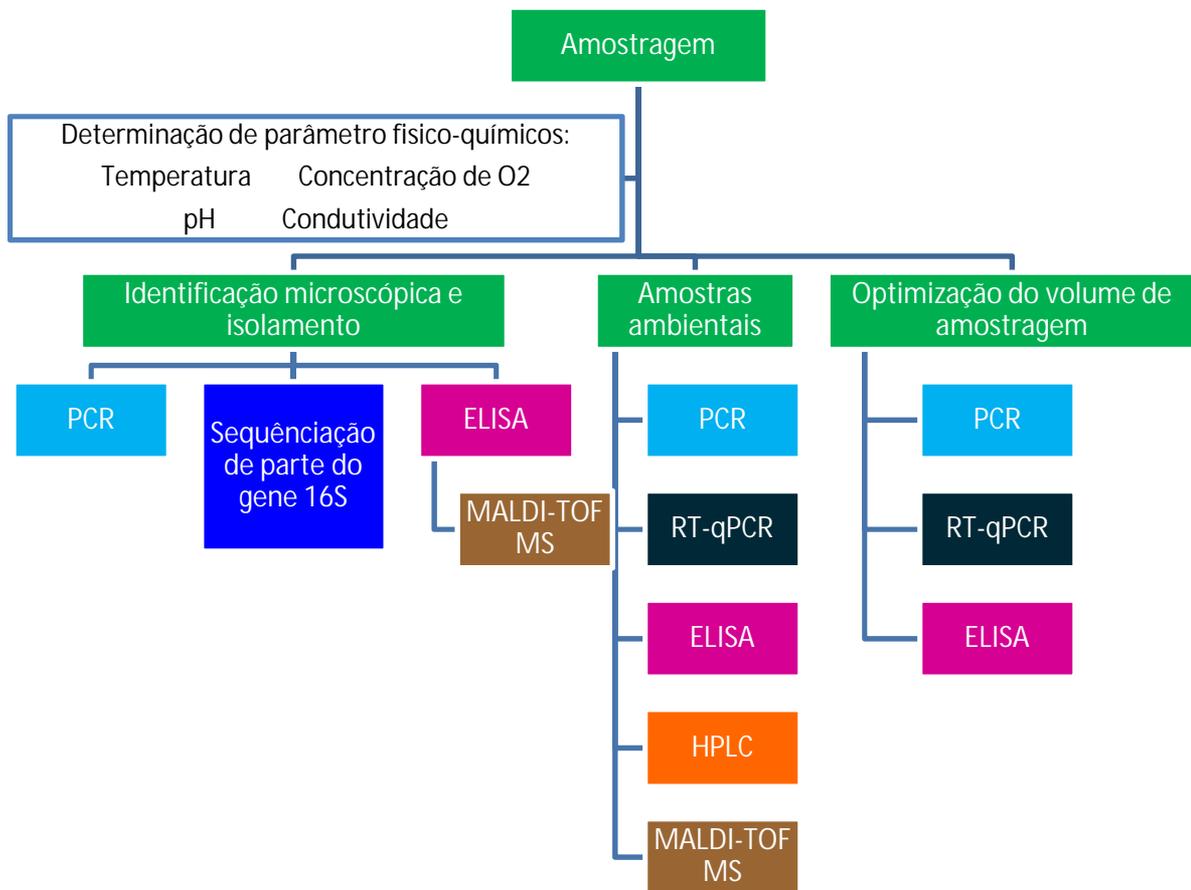


Figura 7- Esquema do plano de amostragem e posterior metodologia laboratorial.

2.3. Isolamento, cultura e identificação de cianobactérias

As cianobactérias foram isoladas num período não superior a 48 horas após amostragem, tendo-se usado a amostra ambiental concentrada.

As diferentes espécies de cianobactérias foram isoladas e identificadas com o auxílio de manuais de ficologia tradicional e de bacteriologia (Baker 1991; Entwisle e Sonneman 1997; Komarek e Anagnostidis 1998; Komarek e Anagnostidis 2005; Albertano *et al.* 2006; Cronberg e Annadotter 2006).

Para o isolamento utilizou-se um microscópio óptico com uma ampliação até 40x e pipetas *pasteur* estiradas à chama de lamparina. As diferentes espécies isoladas foram lavadas em sucessivas gotas de água destilada, até completa libertação de contaminantes visíveis. Após lavagens as cianobactérias foram ressuspendidas em meio Z8 descrito por Kotai em 1972 in Vasconcelos (1995), previamente preparado e distribuído por tubos de ensaio estéreis de poliestireno de 12 ml (fig.8). Os recipientes foram enchidos com meio Z8 apenas até cerca de metade da sua capacidade, para permitir a oxigenação.

Uma gota de amostra concentrada foi igualmente espalhada, com o auxílio de uma ansa esterilizada, por placas de petri de poliestireno estéreis de 60 mm de diâmetro com meio Z8 sólido com agar (1,5%) (fig.9).



Figura 8- Cultura de cianobactérias em meio Z8, em tubos de ensaio estéreis de poliestireno de 12ml.



Figura 9 - Cultura de cianobactérias em meio Z8 sólido, em placas de petri de poliestireno estéreis.

Os tubos e placas de petri foram posteriormente acondicionados numa sala de culturas sob luz artificial (lâmpadas fluorescentes Philips, 40 W), com uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14h dia/10h noite. As colônias de meio líquido foram mantidas nestas condições até atingirem a fase de crescimento exponencial (entre 1 a 2 meses). Das placas de petri, após 1 a 2 semanas, isolou-se para novas placas de petri com meio Z8 sólido as espécies de cianobactérias visíveis, tendo-se procedido a este processo até obtenção de colônias puras, não axénicas, em meio sólido.

Após este período, tanto as colônias provenientes do meio Z8 sólido, como do líquido, foram ressuspensas em frascos de poliestireno esterilizados de 50 mL, previamente cheios com meio Z8 até metade do seu volume (fig.10). As condições de aclimação utilizadas mantiveram-se, com vista a propiciar o crescimento (fig.11).

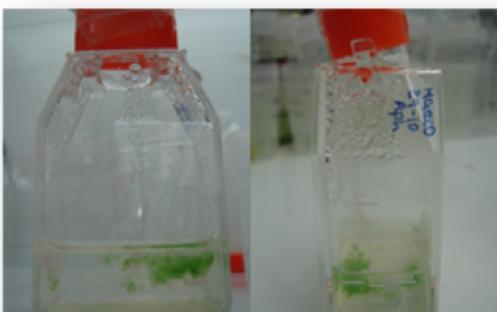


Figura 10 – Cultura de cianobactérias em meio Z8, em frascos de poliestireno estéreis de 50mL.



Figura 11 – Crescimento de cianobactérias em meio Z8.

Durante todo o processo de isolamento as culturas foram observadas periodicamente ao microscópio óptico para assegurar que não havia contaminações algais e se possível fúngicas até à fase de obtenção de culturas unialgais.

A partir do momento em que era obtida uma cultura pura, as cianobactérias foram fotografadas, com recurso a um sistema composto por um microscópio óptico Leica DMLB associado a uma câmara Leica ICCA, com o software Leica Qwin Colour.

A classificação dos géneros com recurso apenas a livros de ficologia e de bacteriologia nem sempre é fácil devido à existência de grandes semelhanças entre diferentes géneros. Sendo assim, algumas das espécies consideradas mais importantes em termos de ocorrência e potencial tóxico, foram igualmente confirmadas por sequenciação molecular.

2.4. Análise molecular

2.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita tanto para amostras ambientais como para as estirpes cultivadas de cianobactérias. A preparação das amostras para posterior extração do DNA diferiu conforme o propósito da amostra:

a) Amostras ambientais

Num período não superior a 24 horas após amostragem, foi filtrado um volume até colmatação do filtro. Para tal foi utilizada a técnica de filtração por vácuo, recorrendo a filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman). O volume filtrado foi dependente do local de amostragem e da turvação da água.

Após filtração a água foi rejeitada, apenas se aproveitando os filtros.

Todo o conteúdo que ficou retido no filtro foi cuidadosamente retirado com o auxílio de um bisturi e colocado num “ependorf” esterilizado, sendo posteriormente acondicionado num congelador a -20°C até à extração do DNA.

b) Amostras ambientais para optimização de volumes

A técnica utilizada foi a mesma que para as amostras ambientais, diferindo apenas no volume filtrado, sendo que em nenhum caso se chegou a atingir a colmatação dos filtros.

c) Culturas de cianobactérias

Quando as culturas se encontravam na fase de crescimento exponencial, um volume de cerca de 1,5 mL de cultura foi retirado para um “ependorf” de 2,0 mL.

Esta amostra foi congelada, pois verificou-se que este passo facilita a extracção do DNA. Em seguida as amostras foram centrifugadas à máxima rotação por 10 minutos recorrendo a uma centrífuga Eppendorf 5415R. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi acondicionado num congelador a -20°C até à extracção do DNA.

O DNA genómico das cianobactérias e das amostras ambientais foi extraído recorrendo a um Kit de extracção de DNA: “Genomic DNA from tissue” (Macherey-Nagel®) e segundo as indicações do fabricante para extracção de DNA genómico de bactérias (Support protocol for bacteria). Para o efeito utilizou-se uma centrífuga Eppendorf 5415R e uma placa de aquecimento com agitação Eppendorf Thermomixer compact. No passo final da extracção, na eluição, foram usados diferentes volumes de tampão de eluição, conforme a proveniência das amostras (100 µL para amostras ambientais e 50 µL para culturas).

A presença de DNA genómico foi confirmado por electroforese num gel de agarose (Molecular Biology Agarose, BioRad) a 1%, numa solução tampão de Tris-Acetato EDTA (TAE 1x, BioRad – 40mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,3). A voltagem aplicada dependeu do tamanho do gel, variando entre 80 a 100V, por um período de 30 a 45 min. Ao gel de agarose foi adicionado 5 µL de brometo de etídio (BioRad) de uma solução stock de 10 mg/ml. Nos poços do gel foram carregados 5 µL de DNA e 1 µL de tampão de carregamento a 1x (Nucleic acid sample loading buffer 5x, BioRad – 50 mM Tris-HCL, pH=8, 25% Glicerol, 5 mM EDTA, 0,2% Azul de Bromofenol e 0,2% Xylene FF). Foram utilizados dois marcadores diferentes ao longo do trabalho, 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb) (fig.12a) e 100bp EZ Load Molecular Ruler (BioRad) (fig.12b). A imagem do gel foi fotografada recorrendo a um transiluminador CSL-MICRODOC System (Cleaver Scientific Ltd.), sob influência de luz ultravioleta, acoplado de uma câmara Cannon PowerShot G9.

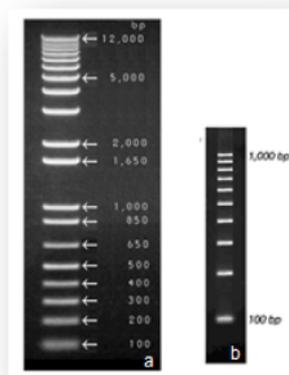


Figura 12 – Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb) (a) e 100bp EZ Load Molecular Ruler (BioRad) (b).

2.4.2. Quantificação do DNA

A quantificação foi feita recorrendo a um aparelho q-bit fluorometer (Invitrogen), de acordo com as informações e reagentes fornecidos pelo fabricante.

2.4.3. Amplificação por PCR

Os “primers” (Invitrogen) utilizados na análise de PCR encontram-se descritos na tabela I. Em relação às condições de reacção iniciais, foram por vezes feitas alterações (tabela I), com vista a melhorar a qualidade da reacção.

Para cada par de “primers” foram realizadas reacções de PCR num volume final de 20µL. Os reagentes foram todos obtidos através da Biotek e cada reacção levou 2µL de tampão de reacção 10x NH₄, 1µL de 50mM de MgCl₂, e de cada “primer”, 2µL de 2,5mM de dNTPs mix, 0,1µL de *Taq* DNA polimerase 5u/µL e 2 µL de DNA para as amostras ambientais e 1 µL para as estirpes cultivadas de cianobactérias. Para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização dos volumes, à reacção de PCR foi adicionado 0,5µL de BSA (bovine serum albumin) (10mg/mL). As reacções decorreram num dos seguintes termocicladores: Biometra Professional Thermocycler e BioRad MyCycler Thermal Cycler.

Para detecção dos genes relativos aos pares de “primers” *Micr184Fw/Micr431Rv*, *mcyA-cd1Fw/mcyA-cd1Rv* e *mcyB2959Fw/mcyB3278Rv*, foi inicialmente realizado um “multiplex” PCR (Saker *et al.* 2007b). Para os pares de “primers” *Cyl2/Cyl4*, *PKSM4/PKSM5* e *K18/M14* também se realizou inicialmente a reacção em multiplex, utilizando-se as condições de reacção relativas ao par de “primers” *K18/M4*. O volume de reacção para a análise de multiplex manteve-se nos 20 µL. Com vista a melhorar a qualidade dos resultados, após as primeiras reacções, começou a realizar-se os PCR's para estes pares de “primers” em reacções separadas.

Os produtos de PCR foram armazenados a 4°C até se proceder à electroforese. Na separação por electroforese em gel de agarose a 1,5/2%, foram usadas as mesmas condições que para visualização de DNA genómico.

Quando os produtos de amplificação eram muito ténues no gel de agarose ou não se tinha a certeza se tinha ocorrido amplificação, foi realizado um “nested” PCR, ou seja, realizou-se uma reacção de PCR, usando como “template” não o DNA genómico inicial, mas sim o produto da amplificação do PCR. As condições da reacção do “nested” PCR foram as mesmas que para a reacção de PCR.

O controlo positivo foi efectuado com a estirpe M6 para detecção dos genes relativos aos “primers” 27F/809R, 740F/1494R, Micr184F/Micr431R, *mcyA*-CD1F/*mcyA*-CD1R, *mcyB*2959F/*mcyB*3278R, PKEF1/PKER1 e HEPF/HEPR e com a estirpe AQS para os restantes “primers”. O controlo negativo foi efectuado com água.

A análise de PCR foi realizada em primeiro para o par de “primers” 27F/809R (tabela1), com o objectivo de amplificar um fragmento de 782 bp (pares de bases) do 16S *rRNA* partilhado por todas as cianobactérias. Este primeiro PCR serviu como controlo positivo das análises de PCR subsequentes. Após confirmada a presença de cianobactérias, foram realizados ensaios com vista a determinar a presença dos dois principais grupos de cianobactérias produtoras das toxinas referidas no presente trabalho, ou seja, para detecção do género *Microcystis* e da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. O par de “primers” Micr184F/431R foi usado para amplificar uma região de 230 bp do gene 16S *rRNA*, específica do género *Microcystis*, para confirmação destes nas amostras. Este par de “primers” tem sido útil para detectar uma larga diversidade de espécies de *Microcystis* (Neilan *et al.* 1997). O par de “primers” cyl2/cyl4, amplifica uma região de 300 bp do gene *rpoC1*, específico da espécie *Cilindrospermopsis raciborskii* (Wilson *et al.* 2000).

Contudo, existem outras espécies capazes de produzir estas toxinas e, a presença de uma espécie já descrita como produtora de toxinas não indica a produção desta. Dentro de uma mesma espécie de cianobactérias podem existir estirpes produtoras e não produtoras de toxinas. Segundo Pearson e Neilan (2008), a produção de toxina depende da presença dos genes responsáveis pela produção da toxina. Sendo assim, caso estes genes estejam presentes, poderá ocorrer a produção das toxinas.

No presente trabalho foram seleccionados “primers” de genes envolvidos na produção de microcistina, nodularina e cilindrospermopsina.

O par de “primers” *mcyA*-Cd1F/*mcyA*-Cd1R amplificou um fragmento de 297 bp do gene *mcyA*, o qual se encontra presente em várias espécies produtoras de microcistinas, como as pertencentes aos géneros *Anabaena*, *Microcystis*, e *Planktothrix* (Hisbergues *et al.* 2003). Amostras positivas para este fragmento têm sido demonstradas como tendo uma elevada probabilidade de produzirem microcistinas (Hisbergues *et al.* 2003; Saker *et al.* 2005a). O par de “primers” *mcyB* 2959F/*mcyB* 3278R amplificou um fragmento de 320 bp do gene *mcyB*, gene presente em estirpes de *Microcystis* produtoras de microcistina. O par de “primers” PKEF1/PKER1 amplificou um fragmento de 755 bp do gene *mcyE*, tendo sido desenhado com base na sequência do gene no género *Microcystis* (Ouahid *et al.* 2005).

Um dos pares de “primers” utilizados neste estudo (HEPF/HEPR) foi desenhado como alvo do local da aminotransferase localizada nos genes *mcyE* e *ndaF*, de microcistinas e

nodularinas sintetases respectivamente, de todas as cianobactérias hepatotóxicas (Jungblut e Neilan 2006), amplificando um fragmento de 472 bp, ao qual se deu o nome de HEP.

Para a detecção de cilindrospermopsina usaram-se os pares de “primers” PKSM4/PKSM5, K18/M14 e M13/M14. Os dois primeiros pares de “primers” foram desenhados como alvo do gene poliquetido sintetase e o último é para a péptido sintetase (Schembri *et al.* 2001), amplificando respectivamente fragmentos de 650, 422 e 597 bp. Estes genes estão envolvidos na biossíntese do metabolismo secundário das cianobactérias e, segundo Schembri e colaboradores (2001), a presença simultânea dos dois genes está associada com a capacidade de produção de cilindrospermopsina.

A confirmação da amplificação por PCR foi feita por electroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente para a presença de DNA genómico.

1.1.1. Preparação das amostras para sequenciação

As culturas que anteriormente foram seleccionadas para análise de PCR, devido à sua ocorrência e potencial tóxico, foram preparadas para sequenciação, com vista a determinar, de forma mais exacta o género, e quando possível a espécie. A sequenciação foi feita para os dois fragmentos do gene *16S rRNA* (27F/809R e 740F/1494R).

Uma vez comprovada por PCR a amplificação do gene *16S rRNA*, foi feita uma nova amplificação dos genes, para um volume de 100 µL, a fim de se poder sequenciar. O volume dos reagentes para a reacção de PCR mantiveram-se na mesma proporção das anteriormente descritas. Após a reacção, o produto da reacção foi purificado recorrendo a um kit para purificação de DNA: “PCR Clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel®) de acordo com a informações do fabricante no protocolo para limpeza de DNA (protocol for PCR clean-up). A única alteração feita ao kit refere-se ao passo de eluição final que foi feita em 30 µL de água ultra-pura estéril.

Por cada amostra a sequenciar foi igualmente enviado 5 µL do respectivo “primer” (10 pmol/µL). Todas as amostras e os “primers” foram enviados para sequenciar para a empresa STABVIDA.

Tabela I – Condições das reacções de PCR para cada par de “primers” utilizados

Gene alvo	Nome do “primer”	Sequência do “primer” (5'-3')	Tamanho (bp)	Reacção de PCR			Referência		
				Desnatu- ração	Emparelhamento			Extensão	
16S rRNA (fragmento específico para cianobactérias)	27F 809R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA	780	92°C 2 m	35 ciclos			72°C 5 m	(Neilan <i>et al.</i> 1997; Jungblut <i>et al.</i> 2005)
					92°C 20 s	50°C 30 s	72°C 1 m		
16S rRNA (fragmento específico para cianobactérias)	740F 1494R	GGCYRWAWCTGACACTSAGGGA TACGGTTACCTTGTACGAC	754	92°C 2m	35 ciclos			72°C 5m	(Neilan <i>et al.</i> 1997)
					92°C 20s	50°C 30s	72°C 1m		
16S rRNA (fragmento específico de <i>Microcystis sp.</i>)	Micr184F Micr431R	GCCGCRAGGTGAAAMCTAA AATCCAAARACCTTCTCCC	220	92°C 2m	35 ciclos			72°C 5m	(Neilan <i>et al.</i> 1997)
					92°C 20s	50°C 30s	72°C 1m		
<i>mcyA</i>	mcyA-CD1F mcyA-CD1R	AAAATTTAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	297	92°C 2m	35 ciclos			72°C 5m	(Hisbergues <i>et al.</i> 2003)
					92°C 20s	56°C 30s	72°C 1m		
<i>mcyB</i>	mcyB2959F mcyB3278R	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAACAATATGATAAGCTAC	350	92°C 2m	35 ciclos			72°C 5m	(Nonneman e Zimba 2002)
					92°C 20s	56°C 30s	72°C 1m		
<i>mcyE</i>	PKEF1 PKER1	CGCAAACCCGATTTACAG CCCCTACCATCTTCATCTTC	755	94°C 5m	40 ciclos			72°C 7m	(Ouahid <i>et al.</i> 2005)
					95°C 60s	52°C 30s	72°C 1m		
<i>mcyE / ndaF</i>	HEPF HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTTGGCCATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472	92°C 2m	40 ciclos			72°C 5m	(Jungblut e Neilan 2006)
					92°C 20s	52°C 30s	72°C 1m		
<i>rpoC1</i> (fragmento específico de <i>Cylindrospermopsis</i>)	CYL 2 CYL 4	GGCATTCTAGTTATATTGCCATACTA GCCCGTTTTTGCCCTTTGCTGC	300	95°C 2m	35 ciclos			72°C 7m	(Wilson <i>et al.</i> 2000)
					95°C 90s	45°C 30s	72°C 50s		
Gene codificante Cilindrospermopsina Poliquetido sintetase	PKS M4 PKS M5	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA AATCCTTACGGGATCCGGTGC	650	95°C 2m	35 ciclos			72°C 7m	(Schembri <i>et al.</i> 2001)
					95°C 90s	55°C 30s	72°C 50s		
Gene codificante Cilindrospermopsina Poliquetido sintetase	K18 M4	CCTCGCACATAGCCATTTGC GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	422	94°C 10m	30 ciclos			72°C 7m	(Schembri <i>et al.</i> 2001; Fergusson e Saint 2003)
					94°C 30s	45°C 30s	72°C 1m		
Gene codificante Cilindrospermopsina Peptido sintetase	M13 M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAAACATCGCTCACTGGTG	597	95°C 2m	35 ciclos			72°C 7m	(Schembri <i>et al.</i> 2001)
					95°C 90s	55°C 30s	72°C 50s		

Uma vez que se amplificou a mesma região dos genes em dois sentidos, com vista a tornar a sequência obtida mais completa, utilizaram-se dois programas disponíveis na internet. O primeiro programa, reverse complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), tinha como objectivo desenvolver a sequência de modo inverso. O segundo, multialin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), alinhava as duas sequências, permitindo por tratamento manual, completar bases em falta ou possíveis erros. Este processo foi realizado para os dois fragmentos do gene *16S rRNA*, e posteriormente, recorrendo novamente ao programa multialin, os dois fragmentos foram alinhados, com vista a que o fragmento para determinação do género ou espécie fosse maior para aumentar a certeza dos resultados. As sequências após todas as correcções foram inseridas na base de dados BLASTn (Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide), integrado no NCBI (Nacional Centre for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome), determinando-se qual a espécie ou género presente na cultura. Esta determinação teve por base uma combinação do máximo “score” e da percentagem de similaridade com o organismo sequenciado.

1.1.2. Amplificação por PCR em tempo real

O ensaio realizado no presente trabalho foi baseado no sistema de detecção com o marcador SYBRGreen, em combinação com um sistema analítico de PCR em tempo real. Esta molécula, quando livre não emite fluorescência mas, quando ligada a cadeias duplas de DNA emite um forte sinal luminoso. O fluoróforo tem a capacidade de se ligar às cadeias duplas de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. À medida que se vão formando mais cadeias duplas de DNA por reacção em cadeia de polimerase, mais moléculas de SYBRGreen se vão ligando a estas. A reacção é monitorizada continuamente, sendo o aumento da fluorescência observado em tempo real. Durante as etapas de desnaturação, devido à quebra das cadeias duplas de DNA, as moléculas de SYBRGreen libertam-se, diminuindo a fluorescência. Uma vez que a detecção da fluorescência ocorre no final de cada etapa de extensão de cada ciclo de PCR, é possível monitorizar a quantidade crescente de DNA amplificado, sendo que a intensidade do sinal gerado é directamente proporcional à quantidade de produto formado.

A quantificação do DNA tem de ser feita na fase exponencial de amplificação. Por PCR em tempo real, esta detecção é feita por determinação do número de ciclos a partir

do qual o aumento da fluorescência passa a ser exponencial. O ponto em que a fluorescência passa este limiar (“threshold”) é denominado por Ct (“threshold cycle”). No final das reacções de amplificação é também determinado o “melting temperature”, ou seja, a temperatura à qual se dá a quebra da cadeia dupla de DNA. Para um par de “primers” específico, a temperatura de desnaturação é sempre igual. Assim, é possível determinar se a fluorescência que se está a ler se deve à amplificação do DNA alvo ou, por exemplo, à formação de dímeros de “primers”. Estes dímeros de “primers” que se formam têm origem em “primers” que se ligam entre eles.

As condições de reacção de PCR em tempo real diferiram das de PCR convencional e encontram-se descritos na tabela II.

A amplificação por RT-qPCR foi efectuada para as amostras ambientais e para as amostras ambientais para optimização dos volumes de amostragem, para os genes relativos aos seguintes “primers”: Cya359F/Cya781R, Micr184F/Micr431R, *mcyA-CD1F/mcyA-CD1R* e *mcyB2959F/mcyB3278R*. A reacção foi realizada com 5 µL de DNA, 0,4 µM de cada “primer” (tabela II) e 1x IQ SYBRGreen Supermix (Biorad), num volume final de reacção de 25 µL. Com vista à obtenção de melhores resultados e para diminuir possíveis interferências de contaminantes ambientais, as amostras foram diluídas numa proporção de 1:10. A reacção de amplificação foi feita num termociclador BioRad ICycler™ Real-Time PCR Detection System. No final de cada extensão da reacção de RT-qPCR, foi ainda realizado um quarto ciclo, com o objectivo de determinar os valores de “melting temperature”. Para tal, o ciclo começou a 55°C, sofrendo um aumento de 0,5°C a cada 30 segundos, num total de 81x, ou seja, até se atingir os 95°C. A análise dos dados foi feita recorrendo ao software da BioRad IQ5.

Para a quantificação do DNA alvo é necessária a construção de uma recta padrão. A recta padrão é baseada em concentrações de células predeterminadas e estabelecida automaticamente pelo software, relacionando concentrações de DNA conhecidas, com valores de Ct dessas amostras. Como controlos para a reacção de PCR em tempo real, foram utilizadas 6 diluições de uma cultura de uma estirpe de *Microcystis aeruginosa* (M6) com concentração inicial de $1,19 \times 10^6$ céls/mL (determinadas por contagem microscópica directa), sendo que para as várias diluições efectuadas se obteve uma gama de concentrações entre $1,19 \times 10^6$ céls/ml e 1,19 céls/mL.

Tabela II - Condições da reacção de PCR em tempo real para cada par de “primers”

Gene alvo	Nome do “primer”	Reacção de RT-qPCR				Referência	
		Desnaturação	Emparelhamento		Extensão		
16S rRNA	Cya359F Cya781R	95°C 5 min	50 ciclos			95°C 1 min	(Nubel <i>et al.</i> 1997)
			95°C 15 s	60°C 15 s	72°C 30 s		
16s rRNA (fragmento específico de <i>Microcystis sp.</i>)	Micr 184F Micr 431R	95°C 5 min	40 ciclos			95°C 1 min	(Neilan <i>et al.</i> 1997)
			95°C 15 s	52°C 30 s	72°C 30 s		
<i>mcyA</i>	<i>mcyA</i> - CD1F <i>mcyA</i> - CD1R	95°C 8 min	40 ciclos			95°C 1 min	(Hisbergues <i>et al.</i> 2003)
			95°C 15 s	59°C 30 s	72°C 30 s		
<i>mcyB</i>	<i>mcyB</i> 2959F <i>mcyB</i> 3278R	95°C 8 min	40 ciclos			95°C 1 min	(Nonneman e Zimba 2002)
			95°C 15 s	59°C 30 s	72°C 30 s		

1.2. Ensaio enzimático ELISA

1.2.1. Preparação das amostras

Para as culturas, a preparação das amostras para ensaio de ELISA foi feito quando estas se encontravam na fase de crescimento logarítmico, pois é nesta fase que ocorre a maior produção da toxina (Apeldoorn *et al.* 2007).

As amostras foram congeladas a -20°C. Em seguida foram sonicadas, na potência máxima (60 Hz) durante 1min (em gelo), utilizando uma sonda de ultrasons (Vibra Cell – Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA).

As amostras ambientais foram sonicadas, como descrito para as culturas. Nas amostras para optimização do volume, após sonicação o material foi novamente congelado para poder ser liofilizado. No final da liofilização, os extractos foram dissolvidos num volume igual ao inicialmente utilizado, com água ultra-pura esterilizada e depois filtradas por filtros Millex 0.45 µm.

Até realização dos testes de ELISA as amostras foram acondicionadas no congelador a -20°C.

1.2.2. Detecção de toxinas por ELISA

A detecção de toxinas por ELISA (Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi feita recorrendo a dois kits de ELISA. Um dos kits tinha como objectivo a detecção de toxinas hepatóxicas, as microcistinas (EnviroGard™ Microcystins Plate Kit, Strategic Diagnostic Inc., Newark, NJ, USA). Este teste não permite a distinção entre algumas variantes de microcistina (MC), detectando, entre outras, MC-LR, MC-RR, MC-YR e Nodularinas. Assim, o resultado é expresso em Microcistina-LR equivalente. O outro kit permitia a detecção da cianotoxina cilindrospermopsina (Cylindrospermopsin ELISA (Microtiter Plate), Abraxis).

Detecção de microcistinas por ELISA

A detecção de microcistinas por ELISA foi realizada para as amostras ambientais (num volume de 10 mL para preparação dos extractos), para as amostras ambientais com vista a optimização dos volumes (volumes compreendidos entre 2 e 50 mL) e ainda para algumas das estirpes de cianobactérias isoladas. Todas estas amostras, antes da execução dos ensaios foram preparadas conforme descrito no passo anterior. Para além destes, para as amostras ambientais, foi igualmente realizado o ensaio sem haver a preparação prévia dos extractos. O objectivo consistiu em poder discernir entre a quantidade de toxina já existente no meio e a quantidade após a disrupção das células, ou seja, a que se encontrava no interior das cianobactérias.

A calibração deste teste é feita através de uma MC-LR não tóxica, a níveis de 0,1; 0,2; 0,4; 0,56; 0,8 e 1,6 ppb. O kit possui anticorpos policlonais que se ligam tanto a microcistinas, como a conjugados microcistina-enzima, e que se encontram imobilizados nas paredes dos poços do kit. As microcistinas presentes nas amostras vão competir com os conjugados microcistina-enzima por um número limitado de locais de ligação aos anticorpos.

Uma vez que em cada poço do teste existe um igual número de locais de ligação aos anticorpos, e cada poço recebe um mesmo número de moléculas de conjugados microcistina-enzima, uma amostra com uma menor concentração de microcistinas permite que se liguem aos anticorpos um maior número de moléculas de conjugado microcistina-enzima, obtendo-se neste caso, uma solução azul escura. Inversamente, uma alta concentração de microcistinas na amostra, permite uma menor ligação de moléculas conjugadas microcistinas-enzima aos anticorpos, obtendo-se uma solução azul clara.

Os resultados obtidos foram analisados espectrofotometricamente a 450 nm, com o auxílio de um espectrofotómetro Synergy HT (BioTek).

O ensaio foi feito com todas as amostras em duplicado, assim como para os controlos positivos e negativo. Com base nos resultados obtidos para os controlos positivos, numa folha de Microsoft® Office Excel, foi contruída uma curva de calibração. Com base nesta curva e nos valores obtidos por espectrofotometria para cada amostra, foi possível determinar a concentração de microcistina em cada amostra. Os resultados obtidos foram expressos em µg/L. Sempre que algum valor de amostra se encontrava acima de 1,6 µg/L, ou seja, fora da recta de calibração, foi necessário realizar diluições das amostras (1:10 e 1:50) com o objectivo de determinar de forma mais correcta a concentração de microcistinas. Valores inferiores a 0,10 µg/L foram considerados negativos.

Detecção de cilindrospermopsina por ELISA

A detecção de cilindrospermopsina foi feita apenas para as amostras ambientais. Este teste baseia-se no princípio da existência de anticorpos específicos para cilindrospermopsina. Quando numa amostra existe cilindrospermopsina, esta toxina, assim como uma análoga, cilindrospermopsina-HRP vão competir para se ligarem aos anticorpos anti-cilindrospermopsina presentes na solução. Os anticorpos de cilindrospermopsina vão depois ligar-se a um segundo anticorpo (ovelha anti-coelho) imobilizados na placa. Após um passo de lavagem e da adição de uma solução substrato, dá-se uma reacção colorimétrica. A intensidade da cor azul é inversamente proporcional à concentração de cilindrospermopsina presente na amostra. A reacção após um tempo específico é parada e a cor é avaliada por espectrofotometria a 450 nm, com o auxílio de um espectrofotómetro Synergy HT (BioTek).

A calibração deste teste é feita com base em 7 amostras padrão de 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 ng/L, assim como por um controlo de 0,75 ng/L. A análise dos resultados foi feita recorrendo ao uso do Microsoft® Office Excel, realizando os cálculos fornecidos pelo fabricante. A concentração das amostras foi determinada recorrendo à construção de uma curva de calibração. Amostras com uma concentração inferior a 0,05 ng/L de cilindrospermopsina foram consideradas negativas. Amostras com uma concentração superior a 2,0 ng/L foram diluídas e repetido o ensaio.

1.3. Detecção e quantificação de microcistinas por HPLC

1.3.1. Preparação das amostras

As amostras ambientais foram filtradas num período não superior a 24 horas após amostragem. O volume filtrado foi de 2000 mL. Para tal foi utilizada a técnica de filtração

por vácuo, recorrendo a filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman). Para a filtração foram utilizados, por amostra, tantos filtros quantos os necessários para permitir a filtração do volume total da amostra.

Num goblé foram colocados os filtros e adicionado um volume de 20 mL de metanol a 50% por filtro e triturado mecanicamente até à obtenção de uma solução homogénea. Posteriormente a solução foi submetida a ultrasons (Vibra Cell – Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA). As amostras foram mantidas durante a noite no frigorífico (4°C) e depois foram centrifugadas numa centrifugadora Survall Legend RT Centrifuge (Thermo Electron Corporation) a uma velocidade de 4150rpm por 5 a 10 minutos (até à obtenção de uma solução límpida). O sobrenadante foi aproveitado e colocado numa “hotte” e em banho-maria (40°C) até à evaporação total. A amostra foi depois ressuspensa em 1000µL de metanol (50%) e filtrado por um filtro de 0,2 µm para um vial de HPLC e injectado imediatamente.

1.3.2. Detecção e quantificação por HPLC de microcistinas

O método HPLC (High Performance Liquid Chromatography) baseia-se na leitura de elementos constituintes de uma amostra, comparando o tempo de retenção do padrão, com o tempo das moléculas a investigar.

A concentração de microcistinas nas amostras ambientais foi determinada seguindo o método de HPLC-DAD modificado (Pflugmacher *et al.* 2006). A solução padrão utilizada foi Microcistina-LR (Batch MCLR-108, pureza de 100%), obtida através da DHI Water and Environment (Hoersholm, Denmark). O padrão, os controlos e as amostras foram diluídos numa solução metanólica (50%) (VWR International, Carnaxide, Portugal). O sistema de cromatografia utilizado foi o Merk Lachrom HITACHI HPLC equipado com um interface D-7000, um detector de fluorescência L-7480, uma amostrador automático L-7200 e uma bomba L-7000. Como aparelho externo foi utilizada uma coluna de controlo de temperatura THERMASPHERETMTS-130 (Phenomenex).

O ensaio de microcistinas foi executado usando um Lichrosphere® 100 RP-18 (25cm×4mm, 5µm) equipado com uma coluna guarda Purosphere Star® RP-18 endcapped (4×4mm, 5µm) (Merck, VWR International, Portugal), ambos mantidos a uma temperatura de 40°C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura Milli-Q e acetonitrilo (VWR International, Carnaxide, Portugal), ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, 99,5%) (Sigma-Aldrich Inc, Sintra, Portugal). O acetonitrilo foi previamente filtrado por filtros de membrana de polipropileno hidrofílicas de 0,2µm (Pall Life Sciences).

A separação cromatográfica foi feita com uma taxa de fluxo de 1mL/min, usando um gradiente de eluição que começou com 30% de acetonitrilo, aumentando até aos 70% ao fim de 20 min, seguido de um aumento até aos 100% por 2 min e retornando aos 30% passados 30 min.

O volume injectado foi de 20 µL. As microcistinas foram detectadas devido à sua capacidade de absorvância UV aos 238nm e as concentrações correspondentes foram determinadas usando uma relação linear entre as áreas dos picos a 238nm e a quantidade de toxina padrão injectada. A calibração da curva de microcistinas foi linear entre os 0,25 e os 9,3ppm.

1.1. Detecção de toxinas por MALDI-TOF MS

O método de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) permite a detecção de péptidos e compostos semelhantes a péptidos, eventualmente tóxicos (Martins *et al.* 2005; Saker *et al.* 2005a).

A detecção de toxinas por este método foi feita para as amostras ambientais que apresentaram quaisquer dos genes envolvidos na produção de microcistinas, ou seja, resultados positivos por PCR para os genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* ou para o fragmento HEP. Para as estirpes cultivadas, esta análise foi realizada sempre que houve detecção da toxina por ELISA.

Um volume de cerca de 15 mL de amostra ambiental ou cultura pura de cianobactérias foi congelado e, posteriormente liofilizado (EZ-DRY, FTS Systems, Stone Ridge, New York, USA). Os extractos obtidos foram colocados em eppendorfs e enviados para o Dr. Martin Welker do Technische Universität Berlin na Alemanha, onde foi realizada a análise.

2. Resultados

2.1. Parâmetros físico-químicos e ocorrência de cianobactérias nos locais amostrados

Nos dois locais estudados foram realizadas 4 amostragens a 19 de Setembro (19-Set), 1, 15 e 29 de Outubro (1-Out, 15-Out e 29-Out, respectivamente), tendo-se detectado a presença de cianobactérias tanto no Marco como no Torrão para todas as datas.

As amostragens foram todas realizadas entre as 11h e as 12h. No local de amostragem foram determinados os parâmetros físico-químicos de temperatura (°C) (fig.13), oxigénio dissolvido (mg/L) e saturação de oxigénio (%) (fig.14), pH (fig.15) e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (fig.16). Na data de 19-Set, devido a problemas com o oxímetro, não foi possível quantificar valores de oxigénio dissolvido.

Os parâmetros de pH, oximetria e temperatura não variaram muito entre os dois locais. A condutividade foi sempre superior no Torrão sofrendo, neste local, oscilações maiores ao longo das datas. O pH nas diferentes datas mantém-se semelhante, a oximetria vai aumentando e a temperatura da água diminuindo.

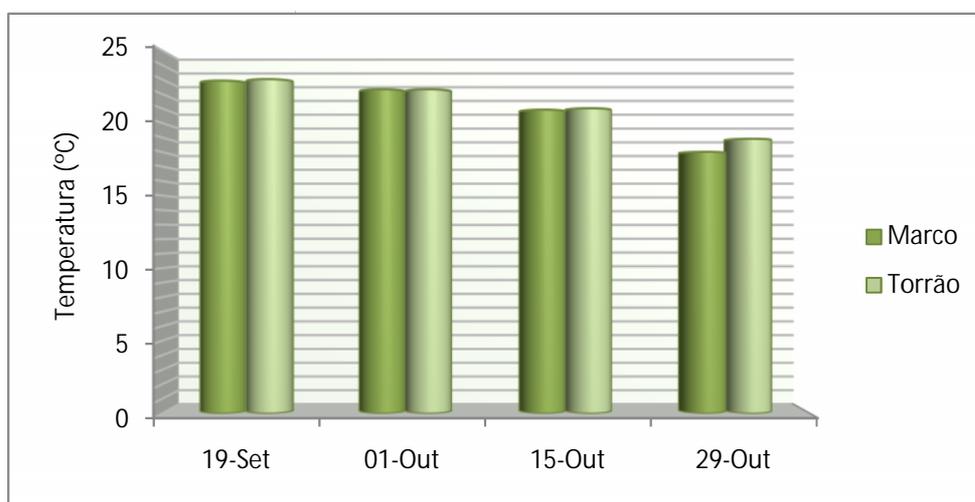


Figura 13 - Valores de temperatura superficial da água (°C) determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.

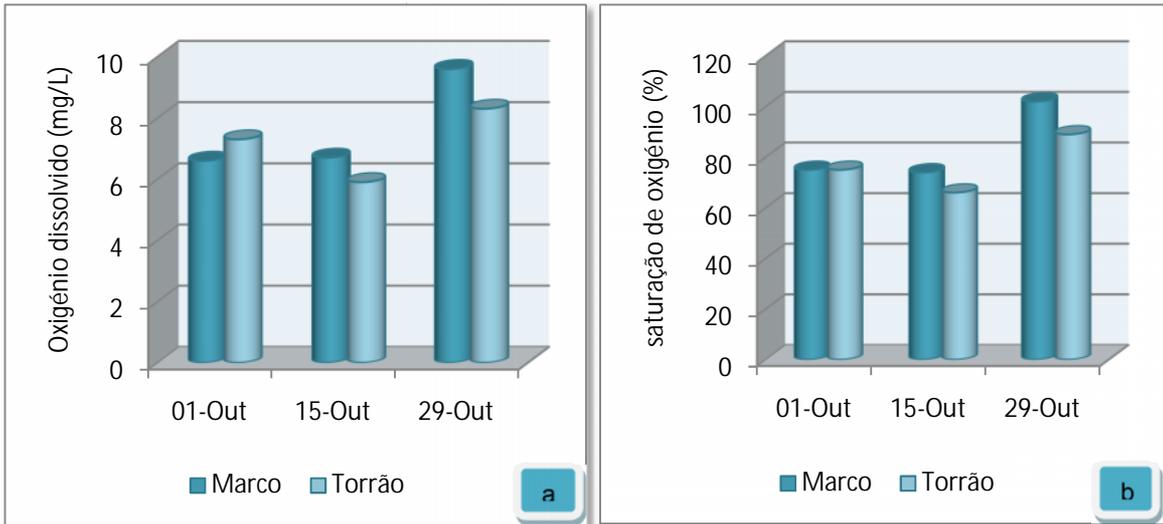


Figura 14a e 14b - Valores de oxigênio dissolvido (mg/L) e saturação de oxigênio (%) determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.

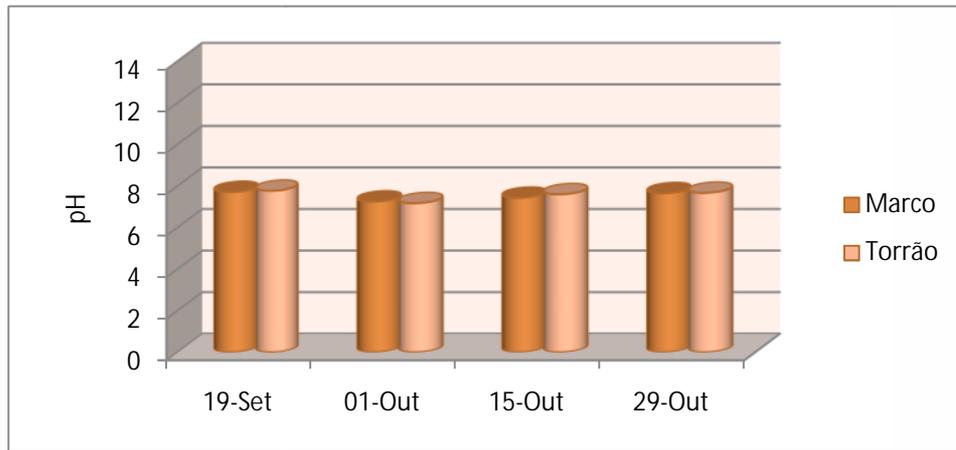


Figura 15 - Valores de pH determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.

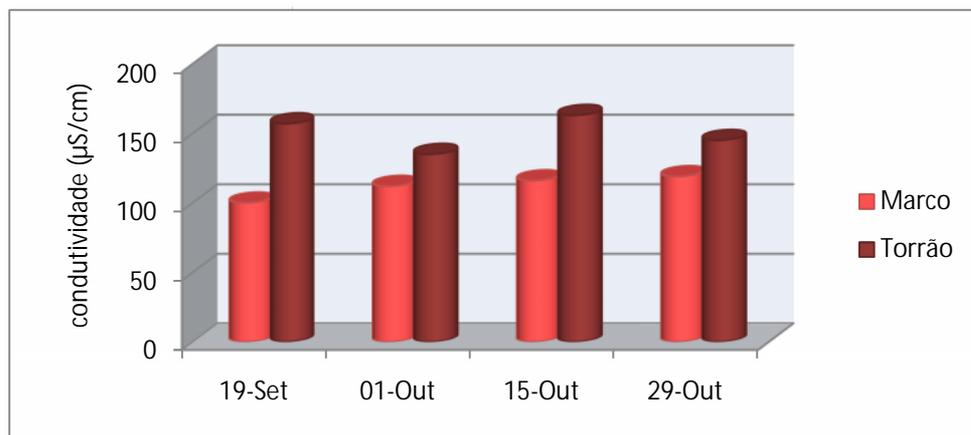


Figura 16 - Valores de condutividade determinados no Marco e Torrão em cada data de amostragem.

Na data de 19-Set, a espécie *Microcystis aeruginosa* era dominante, formando inclusive florescências à superfície da água (fig.17). Este fenômeno era mais evidente no Marco que no Torrão. Ao longo das amostragens a quantidade de *M. aeruginosa* foi diminuindo, sendo que a 29-Out a espécie dominante de cianobactérias era a *Aphanizomenon flos-aquae*. A espécie *M. wesenbergii* apareceu conjuntamente com a *M. aeruginosa*, com um padrão de ocorrência semelhante mas sempre em menores quantidades.



Figura 17 - Florescência de cianobactérias no Marco na data de 19-Set.

Por observação microscópica das amostras concentradas com a rede de plâncton identificaram-se e isolaram-se dez espécies de cianobactérias (tabela III). Na figura 18 é possível ver imagens das espécies identificadas.

Das amostras naturais foram isoladas estirpes de cianobactérias, as quais foram mantidas em culturas monoalgais não axêmicas, em meio Z8, com vista a uma caracterização toxicológica.

Tabela III - Espécies microscopicamente identificadas nas amostras do Marco e do Torrão em cada uma das datas de amostragem

Espécies	Marco				Torrão			
	19-Set	01-Out	15-Out	29-Out	19-Set	01-Out	15-Out	29-Out
<i>Anabaena sp.</i>								
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>								
<i>Limnothrix sp.</i>								
<i>Leptolyngbya sp.</i>								
<i>Lyngbya sp.</i>								
<i>Microcystis aeruginosa</i>								
<i>Microcystis wesenbergii</i>								
<i>Oscillatoria sp.</i>								
<i>Pseudonabaena sp.</i>								
<i>Synechocystis sp.</i>								

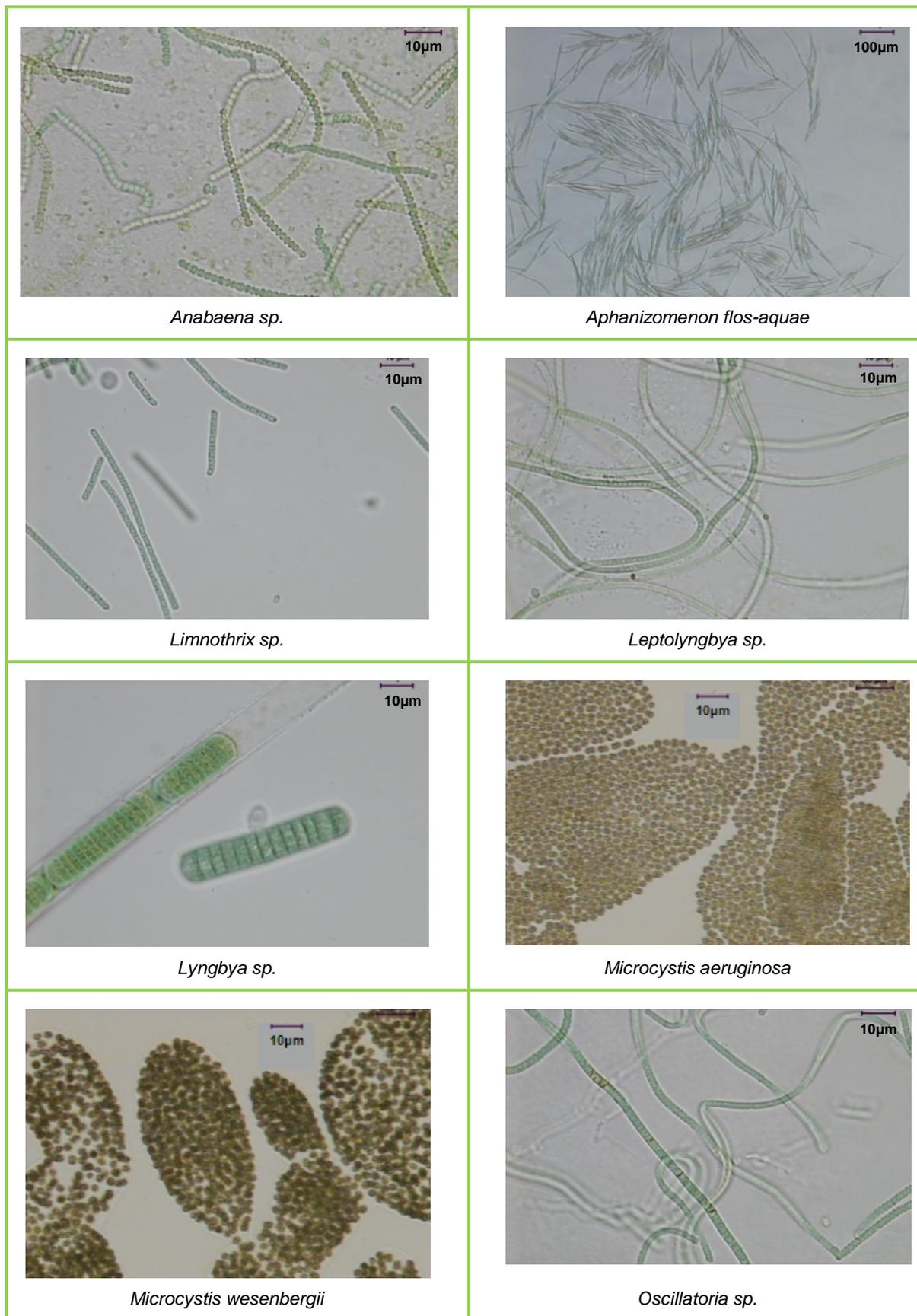


Figura 18 - Fotografías de especies de cianobacterias identificadas por microscopía óptica.

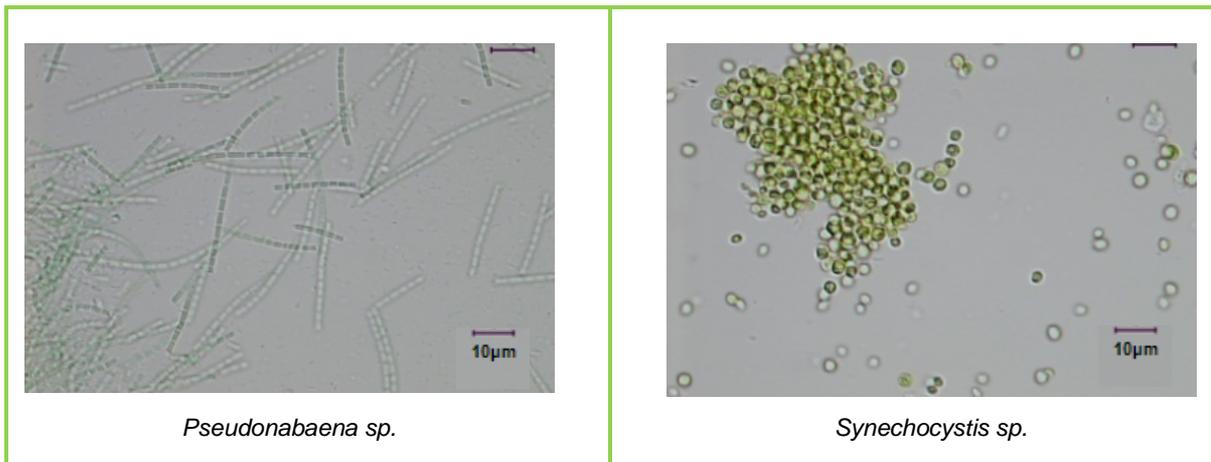


Figura 18 (continuação) – Espécies de cianobactérias identificadas por microscopia óptica.

2.2. Isolamento e cultura de cianobactérias

Com base na ocorrência e potencial tóxico, as espécies que morfologicamente aparentavam ser *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* e *A. flos-aquae* foram cultivadas para posterior análise molecular e imunológica. Também foi isolada e cultivada a espécie *Limnothrix sp.*, pois é uma espécie pouco comum e para que se pudesse comprovar por análise genotípica se realmente era pertencente a este género. Para estas 4 espécies foram isoladas 22 estirpes.

Para a espécie *M. wesenbergii*, foram identificados, quando em cultura, diferentes morfotipos, como é possível observar na figura 19. Para os morfotipos da data de 19-Set, nos dois locais, foram medidas as dimensões das células, sendo que o diâmetro maior foi de $6,47 \pm 1,02 \mu\text{m}$ e o diâmetro menor de $5,86 \pm 0,84 \mu\text{m}$ (média \pm desvio padrão).

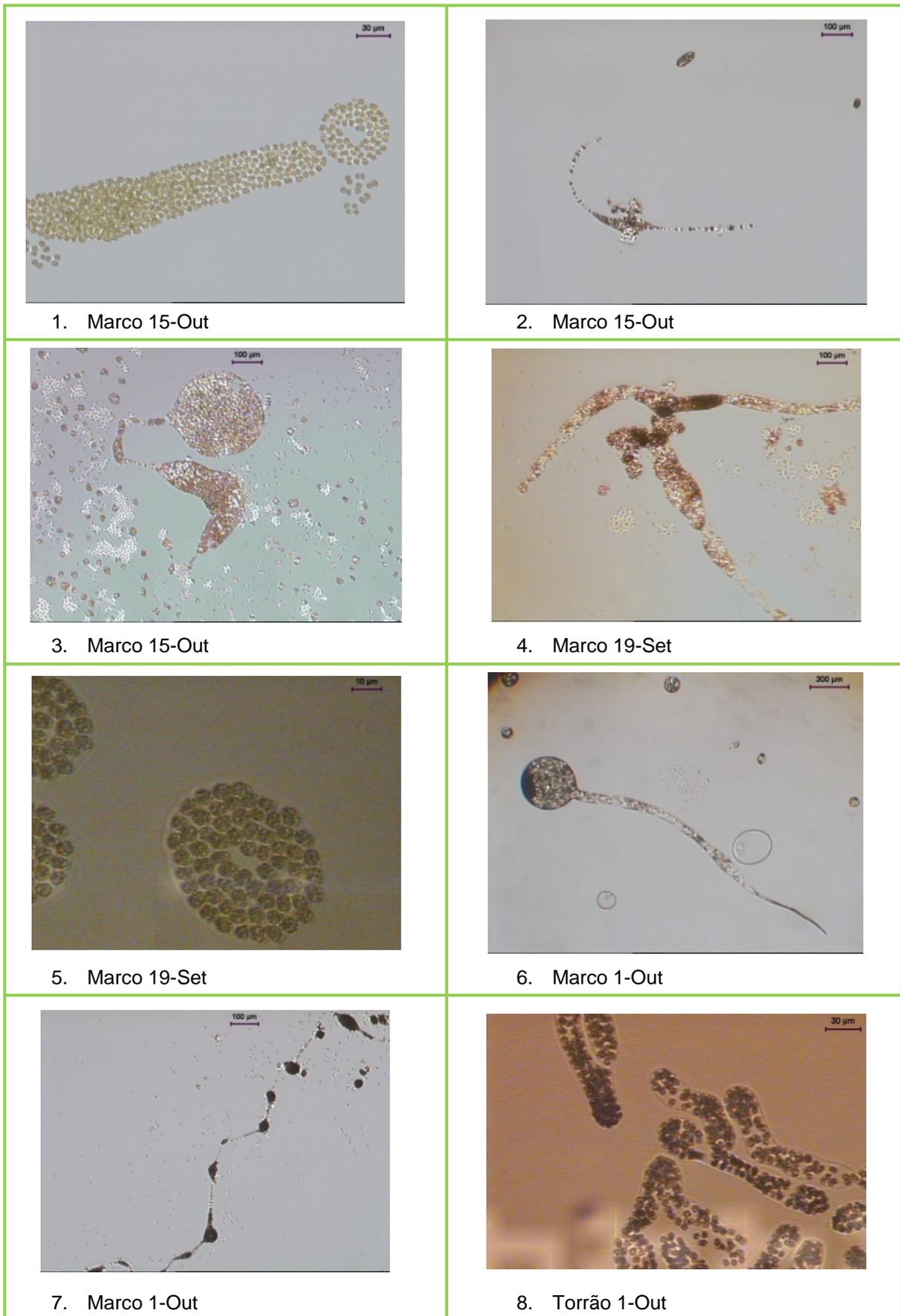
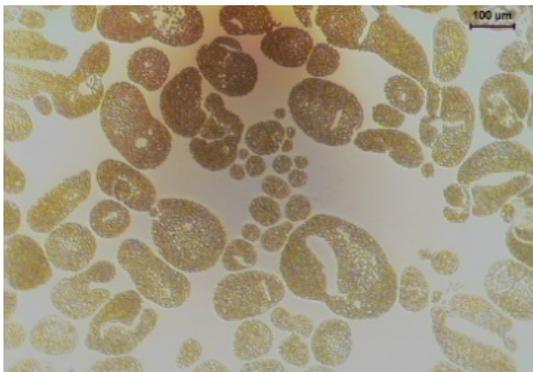
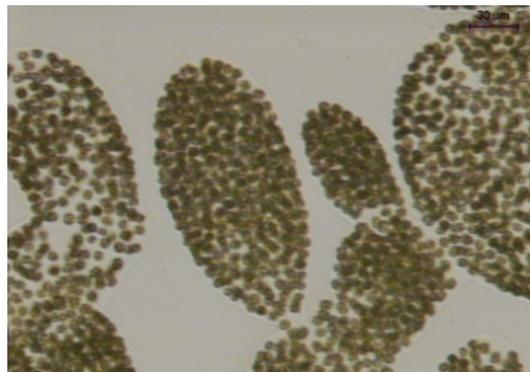


Figura 19 - Morfotipos de *M. wesenbergii* identificados em cultura de laboratório, nas diferentes datas do Torrão e do Marco.



1. Torrão 15-Out



2. Torrão 19-Set



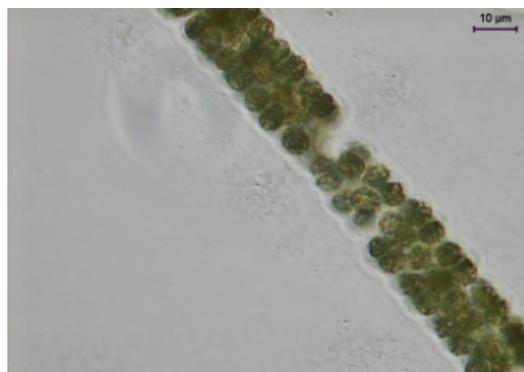
3. Torrão 19-Set



4. Torrão 19-Set



5. Torrão 19-Set



6. Torrão 19-Set



7. Torrão 19-Set

Figura 19 (continuação) - Morfotipos de *M. wesenbergii* identificados em cultura de laboratório, nas diferentes datas do Torrão e do Marco.

2.3. Identificação de cianobactérias (fenotípica e genotípica)

As 22 estirpes de cianobactérias isoladas foram igualmente identificadas genotipicamente. Após a extração do DNA genómico, procedeu-se à amplificação do gene *16S rRNA* numa reacção de 20µL, com os pares de “primers” 27F/809R. A título de exemplo, apresenta-se na figura 20 o resultado da amplificação por electroforese, após a análise de PCR. A numeração das estirpes da figura 20 refere-se às estirpes identificadas na tabela V. Para as restantes estirpes, as fotografias dos géis encontram-se no anexo I.

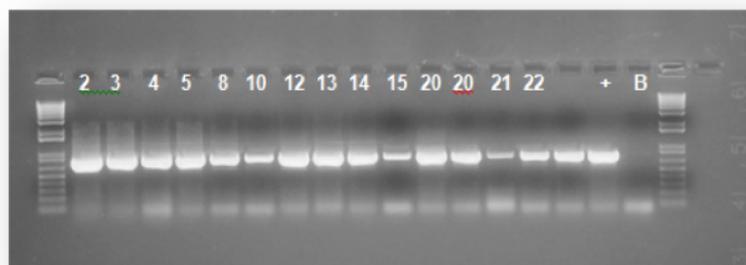


Figura 20 - Produto da amplificação para o gene *16S rRNA* para as estirpes 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22; (+) Controlo positivo; (B) controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb).

Após confirmada uma boa amplificação do gene *16S rRNA* com este par de “primer”, procedeu-se à análise por PCR num volume de 100µL. A amplificação foi igualmente feita, para este volume, para outro fragmento do gene *16S rRNA*, com o par de “primers” 740F/1494R. A amplificação foi feita neste volume para que fosse possível sequenciar.

Os produtos dos dois PCRs realizados foram purificados e sequenciados. Do primeiro par de “primers” resultou uma sequência de 780 pares de bases entre as posições 27 e 809 e do segundo, uma sequência de 754 pares de bases entre as posições 740 e 1494. Estas posições no gene referem-se à numeração do gene *16S rRNA* de *E. coli*. As duas sequências eram contíguas, apresentando uma parte comum, o que permitiu que fossem emparelhadas, obtendo-se no final um fragmento do gene *16S rRNA* de aproximadamente 1460 pares de bases, entre as posições 27 e 1494. As sequências originadas foram analisadas usando o programa BLAST do GenBank. Os resultados da sequenciação encontram-se sumariados na tabela IV, apresentando-se referenciado o género/espécie devolvido, com o respectivo número de acesso do exemplar e a percentagem de similaridade com a estirpe cultivada.

Das 22 estirpes enviadas para sequenciação, foram identificadas 20. Para a estirpe 5 e 20 não se conseguiu obter resultados da sequenciação, sendo referida na tabela como não sequenciada (N.S.). As percentagens de similaridade dos organismos sequenciados

com as estirpes pertencentes à base de dados BLAST foi sempre superior a 93%, sendo que só para estirpes do género *Limnothrix* é que se obtiveram percentagens de similaridade inferiores a 99%.

Tabela IV - Resultados da sequenciação para identificação genotípica das estirpes cultivadas, incluindo nº de acesso da base de dados BLAST e percentagem (%) de similaridade

Estirpe	Identificação final		
	Estirpe	Nº acesso	% similaridade
1	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> 1tu37s13	AJ630442	99%
2	<i>Limnothrix redekei</i> LMECYA 145	EU078512	97%
	<i>Limnothrix</i> sp. CENA110	EF088338	97%
3	<i>Limnothrix redekei</i> LMECYA 145	EU078512	97%
4	<i>Limnothrix</i> sp. CENA110	EF088338	93%
5	N.S.		
6	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
7	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%
8	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC AubB1	AF139304	99%
	<i>Microcystis ichthyoblabe</i> 0BB35S01	AJ635434	99%
9	<i>Microcystis</i> sp. AICB 35	AY672728	100%
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-101	FJ461750	99%
10	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%
11	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%
12	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	100%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	100%
13	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%
14	<i>Limnothrix redekei</i> 165c	AJ505943	97%
15	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%
16	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	100%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	100%
17	<i>Microcystis aeruginosa</i> gene isolate TAC170	AB012340	99%
18	<i>Microcystis</i> sp. AICB 34	AY672727	99%
	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC AubB1	AF139304	99%
19	<i>Microcystis ichthyoblabe</i> 0BB35S01	AJ635434	100%
	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC AubB1	AF139304	100%
20	N.S.	FJ839355	99%
21	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	100%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	100%
22	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain UWOCC C4	AF139316	99%
	<i>Microcystis wesenbergii</i> gene	AB035553	99%

N.S. – não sequenciada

As sequências amplificadas para cada uma das estirpes cultivadas encontram-se no anexo II. Com base nos resultados das sequenciações e na identificação microscópica, identificou-se 1 *Aphanizomenon flos-aquae*, 4 *Limnothrix* sp., 10 *M. aeruginosa* e 7 *M. wesenbergii* (tabela V). A distinção entre *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii* foi apenas

possível morfologicamente, sendo estas espécies classificadas como morfoespécies, uma vez que geneticamente são iguais.

Tabela V - Cianobactérias identificadas genotipicamente e microscopicamente

Estirpe	Espécie
1	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
2	<i>Limnothrix sp.</i>
3	<i>Limnothrix sp.</i>
4	<i>Limnothrix sp.</i>
5	<i>Microcystis aeruginosa</i> *
6	<i>Microcystis aeruginosa</i>
7	<i>Microcystis aeruginosa</i>
8	<i>Microcystis aeruginosa</i>
9	<i>Microcystis aeruginosa</i>
10	<i>Microcystis wesenbergii</i>
11	<i>Microcystis wesenbergii</i>
12	<i>Microcystis wesenbergii</i>
13	<i>Microcystis wesenbergii</i>
14	<i>Limnothrix sp.</i>
15	<i>Microcystis aeruginosa</i>
16	<i>Microcystis aeruginosa</i>
17	<i>Microcystis aeruginosa</i>
18	<i>Microcystis aeruginosa</i>
19	<i>Microcystis aeruginosa</i>
20	<i>Microcystis wesenbergii</i> *
21	<i>Microcystis wesenbergii</i>
22	<i>Microcystis wesenbergii</i>

*Identificação baseada apenas na análise microscópica

2.4. Análise de PCR para detecção de espécies potencialmente produtoras de toxinas e de genes envolvidos na produção destas

Após a extracção do DNA, a eficiência da extracção e presença de DNA foi confirmada por electroforese em gel de agarose. Para as amostras ambientais com vista à optimização do volume foi também quantificado o DNA genómico através do método do q-Bit. Todas as amostras, ambientais ou de estirpes cultivadas apresentaram banda no gel de agarose, confirmando a boa eficiência de extracção.

A análise da reacção em cadeia de polimerase (PCR) foi feita para as amostras ambientais, para as amostras ambientais com vista à optimização dos volumes e para as 22 estirpes cultivadas. Todas as fotografias referentes à análise de PCR encontram-se compiladas no anexo I.

Inicialmente a análise de PCR foi feita para o gene *16S rRNA*. Após a confirmação da presença do gene, ou seja, a confirmação da presença de cianobactérias, procedeu-se à detecção de genes referentes aos dois principais grupos de organismos produtores das toxinas estudadas no presente trabalho, ou seja, *Microcystis spp.* e *Cylindrospermopsis*

raciborskii. Por fim, foram feitas amplificações com o objectivo de detectar a presença de genes envolvidos na produção de cilindrospermopsina, nodularina e microcistina. Nas análises de PCR efectuadas, os resultados relativos às amplificações com os pares de “primers” Cyl2/Cyl4, PKSM4/M5, K18/M4 e M13/M14 foram sempre negativos.

Inicialmente a análise de PCR para os genes relativos aos pares de primers Micr184Fw/Micr431Rv, *mcyA*-cd1Fw/*mcyA*-cd1Rv e *mcyB*2959Fw/*mcyB*3278Rv foi realizada em multiplex PCR. O mesmo foi feito para os pares de “primers” Cyl2/Cyl4, PKSM4/PKSM5 e K18/M14. A resolução das imagens de electroforese, devido ao facto de os fragmentos terem, por vezes, tamanho (em pares de bases) muito semelhantes, não foi boa. Assim, a análise para todos estes fragmentos passou a ser feita apenas para um par de “primers” por reacção de PCR. Na figura 21 é possível visualizar um dos resultados de multiplex PCR para os pares de “primers” Micr184Fw/Micr431Rv, *mcyA*-cd1Fw/*mcyA*-cd1Rv e *mcyB*2959Fw/*mcyB*3278Rv. O par de “primers” Micr184Fw/Micr431Rv amplificou um fragmento de 220 bp, e o par de “primers” *McyA*-cd1Fw/*mcyA*-cd1Rv um fragmento de 297 bp. Na imagem a distinção destes dois fragmentos não é boa, sendo que, nos casos em que só surge um deles não é possível discernir, com toda a certeza, qual dos dois fragmentos foi amplificado.

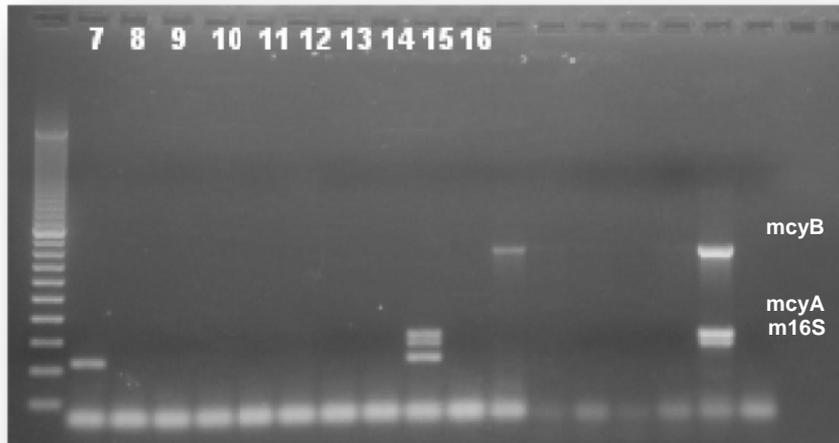


Figura 21 - Produto da amplificação dos fragmentos *16S rRNA* específico de *Microcystistis sp.*, *mcyA* e *mcyB* para um volume de 20 μ L, numa reacção de multiplex PCR. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)

2.4.1. Amostras ambientais

A análise de PCR foi feita para as amostras ambientais nas 4 datas de amostragem, para o Marco e o Torrão. Os resultados da análise de PCR encontram-se sumariados na tabela VI. Os resultados para os pares de “primers” Cyl2/Cyl4, PKS M4/M5, K18/M4 e M13/M14, não se encontram descritos na tabela por terem sido todos negativos.

Tabela VI - Resultados da análise de PCR para as amostras ambientais

		<i>16S rRNA</i>	<i>Micr16S</i>	<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyE</i>	HEP
Marco	19-Set	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1-Out	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	15-Out	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
	29-Out	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Torrão	19-Set	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	1-Out	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	15-Out	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	29-Out	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Em todas as amostras ambientais foi detectada a presença de cianobactérias e do género *Microcystis*. Quanto aos genes envolvidos na produção das toxinas, foi sempre detectado pelo menos um deles, com excepção da data de 29-Out no Torrão, onde não foi detectado nenhum deles. O gene *mcyE* foi o que mais vezes se detectou. Nas duas primeiras datas de amostragem no Marco foram detectados os 4 genes, ou seja, *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* e o fragmento HEP. A figura 22 é um exemplo de uma fotografia de um gel de agarose, da amplificação do gene *mcyA* para as amostras ambientais.

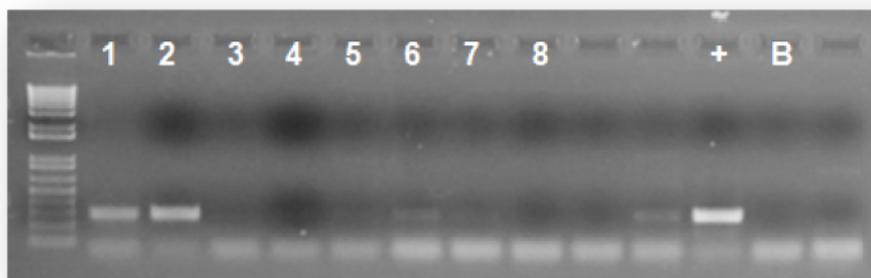


Figura 22 – Produto da amplificação do fragmento do gene *mcyA* para um volume de 20µL. (1) Marco 19-Set; (2) Marco 1-Out; (3) Marco 15-Out; (4) Marco 29-Out; (5) Torrão 19-Set; (6) Torrão 1-Out; (7) Torrão 15-Out; (8) Torrão 29-Out; (+) Controlo positivo (estirpe M6); (B) Controlo negativo.

2.4.2. Amostras ambientais para otimização do volume

A análise de PCR para otimização dos volumes de amostragem foi realizada para o Marco e o Torrão nas datas de 19-Set e 1-Out. Os volumes iniciais amostrados variaram entre 15mL e 1000mL e encontram-se descritos na tabela VII. Na mesma tabela encontram-se os resultados da amplificação para os vários genes.

Tabela VII - Resultados da análise de PCR para otimização do volume de amostragem das amostras ambientais

			16S rRNA	Micr16S	mcyA	mcyB	mcyE	HEP
Marco	19-Set	15 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		50 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		250 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		500 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1-Out	250mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		500 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		1000 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Torrão	19-Set	50 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
		250 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
		500 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
		1000 mL	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
	1-Out	250 mL	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
		500 mL	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		1000 mL	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

Os resultados da amplificação, nestas duas datas estão de acordo com os obtidos para as amostras ambientais, com exceção do Torrão a 1-10 para o gene *mcyA* e o fragmento HEP. Para a amplificação do fragmento do gene *mcyE*, nas amostras do Torrão a 19-Set e 1-Out, e para o fragmento HEP (fig.23) para o mesmo local a 19-Set, os resultados não foram sempre iguais. A variação do volume amostrado interferiu nos resultados, sendo que a amplificação, ocorre sempre para o menor volume amostrado.



Figura 23 - Produto da amplificação do gene HEP para um volume de 20 μ L. (1-4) Marco 19-Set; (5-7) Marco 1-Out; (8-11) Torrão 19-Set; (12-14) Torrão 1-Out; (1) 15mL; (2) 50mL; (3) 250mL; (4) 500mL; (5) 250mL; (6) 500mL; (7) 1000mL; (8) 50mL; (9) 250mL; (10) 500mL; (11) 1000mL; (12) 250mL; (13) 500mL; (14) 1000mL; (+) Controlo positivo (estirpe M6); (B) Controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)

A figura 24 mostra a amplificação do fragmento do gene *mcyA* para optimização do volume de amostragem. Para além da detecção, para os fragmentos dos genes *mcyE* e para o fragmento HEP foi possível observar mais resultados positivos para os menores volumes. Na figura 24 é possível observar, para o gene *mcyA*, que o produto da amplificação, quando positivo, parece ser maior para os menores volumes amostrados. Esta constatação baseia-se apenas na intensidade da banda. A confirmação é possível por PCR em tempo real, onde além da detecção é possível a quantificação.

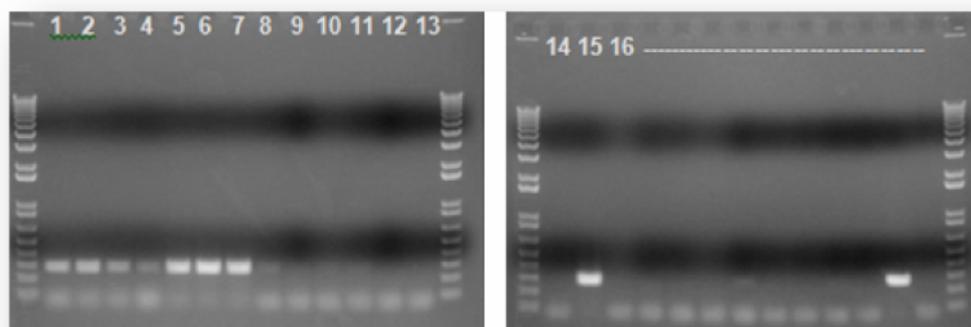


Figura 24 - Produto da amplificação do fragmento do gene *mcyA* para um volume de 20 μ L. (1-4) Marco 19-Set; (5-7) Marco 1-Out; (8-11) Torrão 19-Set; (12-14) Torrão 1-Out; (1) 15mL; (2) 50mL; (3) 250mL; (4) 500mL; (5) 250mL; (6) 500mL; (7) 1000mL; (8) 50mL; (9) 250mL; (10) 500mL; (11) 1000mL; (12) 250mL; (13) 500mL; (14) 1000mL; (15) Controlo positivo (estirpe M6); (16) Controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)

2.4.3. Estirpes isoladas

Na tabela VIII estão apresentados os resultados de PCR para as estirpes isoladas. Todas as estirpes classificadas como pertencentes ao género *Microcystis* tiveram amplificação positiva para o fragmento do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis sp.* (micr16S). Só estirpes da espécie *M. aeruginosa* (estirpes 5 a 13 e 15 a 22), tiveram resultados positivos para os genes *mcyA*, *mcyB* e para o fragmento HEP, com percentagens de 30%, 20% e 40%, respectivamente. A estirpe 15 (*M. aeruginosa*) apenas apresentou amplificação para o fragmento HEP, para além do *16S rRNA* e do fragmento do *16S rRNA* específico de *Microcystis sp.*. A amplificação do gene envolvido na produção de microcistinas e nodularinas e a não amplificação de qualquer dos outros genes envolvidos na produção de microcistinas pode indicar uma possível produção de nodularina.

As estirpes do género *Limnothrix* e da espécie *M. wesenbergii* não apresentaram amplificação para nenhum dos genes envolvidos na biossíntese da toxina pesquisados.

O gene *mcyE* foi amplificado em 50% das estirpes de *M. aeruginosa* e ainda para a estirpe 1, *A. flos-aquae*. Duas das estirpes de *M. aeruginosa* (9 e 16) apresentaram amplificação para todos os genes descritos na tabela VIII.

Para os pares de “primers” micr16S e *mcyB*, não foram realizadas reacções de PCR para as estirpes que não tinham sido identificadas como pertencentes ao género *Microcystis*, uma vez que estes “primers” são específicos para fragmentos dos genes deste género.

Na figura 25, a título de exemplo, é possível ver o produto da amplificação para o gene *mcyB*.

Tabela VIII - Resultados da análise de PCR para as estirpes cultivadas

N.A.- Não amplificado

Estirpe	Espécie	Local e data da amostragem	16S rRNA	Micr16S	<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyE</i>	HEP
1	<i>A. flos-aquae</i>	Marco 29/10	Positivo	N.A.	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
2	<i>Limnothrix sp.</i>	Marco 1/10	Positivo	N.A.	Negativo	N.A.	Negativo	Negativo
3	<i>Limnothrix sp.</i>	Marco 15/10	Positivo	N.A.	Negativo	N.A.	Negativo	Negativo
4	<i>Limnothrix sp.</i>	Marco 29/10	Positivo	N.A.	Negativo	N.A.	Negativo	Negativo
5	<i>M. aeruginosa</i>	Marco 19/9	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
6	<i>M. aeruginosa</i>	Marco 19/9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	<i>M. aeruginosa</i>	Marco 1/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	<i>M. aeruginosa</i>	Marco 15/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	<i>M. aeruginosa</i>	Marco 15/10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10	<i>M. wesenbergii</i>	Marco 19/9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	<i>M. wesenbergii</i>	Marco 1/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	<i>M. wesenbergii</i>	Marco 15/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	<i>M. wesenbergii</i>	Marco 29/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	<i>Limnothrix sp.</i>	Torrão 1/10	Positivo	N.A.	Negativo	N.A.	Negativo	Negativo
15	<i>M. aeruginosa</i>	Torrão 19/9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	<i>M. aeruginosa</i>	Torrão 15/10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
17	<i>M. aeruginosa</i>	Torrão 15/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	<i>M. aeruginosa</i>	Torrão 29/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
19	<i>M. aeruginosa</i>	Torrão 29/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
20	<i>M. wesenbergii</i>	Torrão 19/9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	<i>M. wesenbergii</i>	Torrão 15/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	<i>M. wesenbergii</i>	Torrão 29/10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

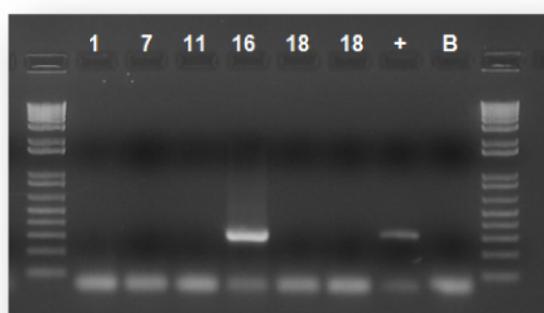


Figura 25 - Produto da amplificação para o fragmento do gene *mcyB* para as estirpes 1, 7, 11, 16 e 18; (+) Controlo positivo; (B) controlo negativo. Marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb)

2.5. Quantificação das toxinas por ELISA e HPLC

Tal como para o ensaio de PCR, o ensaio imunológico de ELISA para quantificação de microcistinas foi realizado para as amostras ambientais, assim como para as amostras ambientais com vista a optimização do volume de amostragem e para as estirpes cultivadas. Todos os valores de toxina determinados abaixo de 0,1µg/L de Microcistina-LR (MC-LR) equivalentes foram considerados negativos, pois estão fora da recta padrão traçada.

Para as amostras ambientais, os resultados de ELISA estão apresentados na figura 26. Os resultados estão expressos em µg de MC-LR equivalentes/L. Este ensaio teve como objectivo não só quantificar a toxina nas amostras naturais, mas também permitir distinguir entre a quantidade de toxina liberta no meio (amostra ambiental: AA) e a quantidade total de toxina, ou seja, endógena e exógena (amostra total: AT). Para determinar a quantidade total da toxina, as células foram previamente submetidas a ultrasons e congeladas, para provocar a ruptura e assim libertar a toxina endógena. Com excepção da amostra do Torrão a 1-Out, em todas as outras não se detectou a toxina na amostra ambiental. Nas duas últimas datas, para os dois locais, não foi detectada a toxina.

O maior valor de toxina determinado foi de 10,62 µg/L de MC-LR equivalentes na data de 1-Out para a amostra total do Marco.

O ensaio de ELISA para optimização do volume de amostragem foi realizado nas datas de 15-Out e de 29-Out para os dois locais, tendo-se amostrado volumes entre 50 e 1000mL para a primeira data e 15 e 50 mL para a segunda. Os valores de toxina resultantes deste ensaio foram todos inferiores a 0,1µg/L de MC-LR equivalentes, considerando-se negativos.

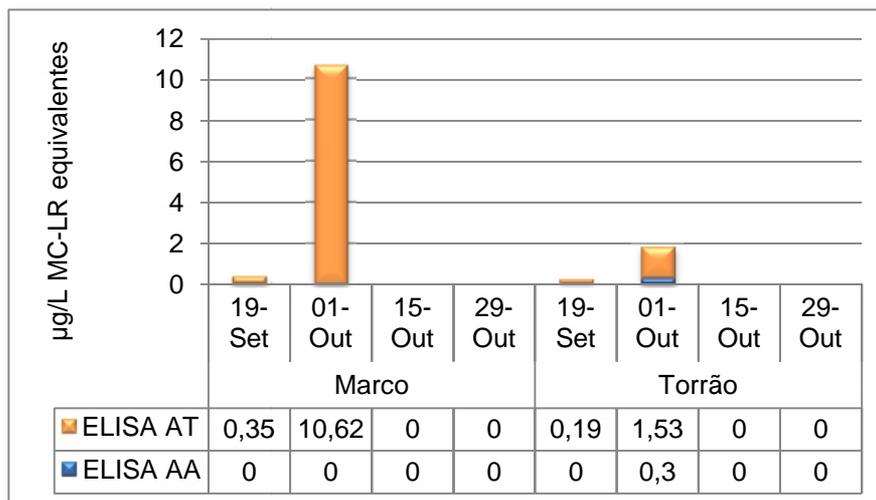


Figura 26 - Comparação dos resultados da análise de ELISA para as amostras ambientais. Os valores estão expressos em μg MC-LR equivalentes por litro. ELISA AA corresponde ao ensaio de ELISA para a quantidade de toxina existente no meio e ELISA AT a quantidade total da toxina (toxina no meio+toxina endógena).

Os resultados do ensaio imunológico de ELISA para as estirpes estão sumariados na tabela IX. O ensaio foi realizado para todas as estirpes que apresentaram pelo menos a amplificação de um dos genes envolvidos na produção da toxina, com excepção da estirpe 5 devido à inexistência de biomassa suficiente para realização do ensaio. Para além destas, o ensaio foi também realizado para as estirpes de *M. aeruginosa* 6 e 7, as quais não apresentaram amplificação para nenhum dos genes envolvidos na biossíntese da toxina. As estirpes de *M. aeruginosa* que apresentaram amplificação para os genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* e para o fragmento HEP, estirpes 9 e 16, obtiveram valores de toxina acima dos $1,1 \mu\text{g/L}$ de MC-LR equivalentes. Nas estirpes sem amplificação por PCR de nenhum destes 4 genes, como é o caso das estirpes 6 e 7, não foi detectada a toxina. Resultados semelhantes foram obtidos para as estirpes 15 e 19, que apresentaram apenas amplificação para um dos genes envolvidos na produção da toxina, respectivamente, para o fragmento HEP e *mcyE*. A estirpe 1, *A. flos-aquae*, apresentou valores de toxina de MC-LR equivalente de $0,28 \mu\text{g/L}$.

Tabela IX - Resultados da quantificação da toxina por análise de ELISA das estirpes cultivadas em μg de MC-LR equivalentes/L

Estirpe	μg MC-LR equivalentes/L
1	0,28
6	0
7	0
9	1,14
15	0
16	1,16
19	0

O ensaio enzimático de ELISA, para as amostras ambientais e para a estirpe 1 foram também realizados para detecção de cilindrospermopsina. Todos os resultados deste ensaio foram negativos, havendo assim coerência entre os resultados de PCR, em que não se amplificou qualquer fragmento de genes envolvidos na biossíntese desta toxina, e os do ensaio de ELISA.

Por HPLC não foi possível detectar a presença de MC-LR. Com base nos cromatogramas da análise de HPLC para o padrão, foi possível determinar que o tempo de retenção para MC-LR foi de aproximadamente $12 \pm 0,1$ minutos. Na figura 27 é possível ver um dos cromatogramas obtidos pela análise de HPLC. No mesmo tempo de retenção do padrão (aproximadamente aos 12 minutos) surgiram em todas as datas do Marco picos mas com um espectro de absorção que não a 238nm. Este pico pode ser relativo a um outro péptido que possa estar presente na amostra, com a mesma afinidade (polaridade) que a MC-LR para a coluna. No espectro de HPLC, em algumas datas surgem dois grandes picos (com tempo de retenção de aproximadamente de 20 min) mas com um espectro de absorção a 268 nm, pelo que não podem ser relativas a outras variantes de microcistinas. Algumas microcistinas são caracterizadas por possuírem um espectro a 220 nm, como as que possuem triptofano. Uma vez que os picos obtidos, em qualquer dos tempos de retenção não são nem a 238nm, nem a 220nm, por HPLC não foram detectadas microcistinas.

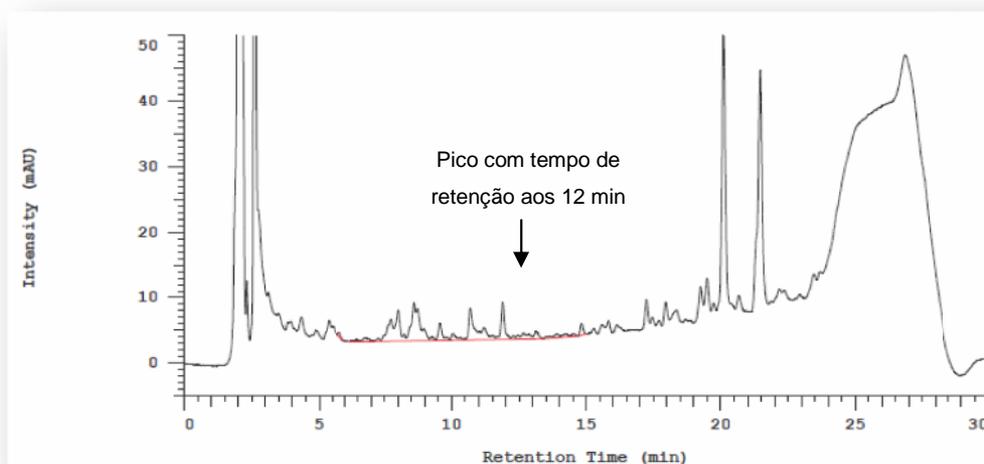


Figura 27 - Cromatograma resultante da análise de HPLC para a amostra ambiental do Marco a 19 de Setembro.

2.6. Detecção das toxinas por MALDI-TOF MS

As amostras ambientais e as estirpes que apresentaram a presença de toxina por ensaio imunológico foram liofilizadas e enviadas para determinação das toxinas por MALDI-TOF MS. Os resultados de MALDI-TOF MS encontram-se na tabela X.

Tabela X - Péptidos identificados através da análise de MALDI-TOF MS

Amostras		Péptidos identificados	
Estirpes	1	-	
	9	Microcistina ou cianopeptolina; microviridina	
	16	Microcistina-LR; aeruginosina	
Amostras ambientais	Marco	19-Set	-
		1-Out	Microcistina-LR; aeruginosinamida; anabaenopeptina F; anabaenopeptina A; microviridina
		15-Out	-
		29-Out	-
	Torrão	19-Set	-
		1-Out	-
		15-Out	-
		29-Out	-

Os espectros de MALDI-TOF MS encontram-se no anexo III.

Para as amostras ambientais só foi detectada MC-LR no Marco a 1-Out (fig.28). Nessa mesma data foram detectados outros péptidos. Devido à existência de quantidades muito reduzidas de amostra ambiental, a quantidade de amostra enviada para análise de MALDI-TOF MS foi, por vezes, quase inexistente, podendo explicar o facto de não terem sido detectados péptidos em mais nenhuma data.

A estirpe 1, apesar de por ELISA se ter detectado a toxina, não foi positivo para microcistina por MALDI-TOF MS. Na estirpe 6 foi detectado um pico de microviridina e um outro que tanto pode ser de microcistina, como de cianopeptolina. Na estirpe 16 detectou-se aeruginosina e MC-LR.

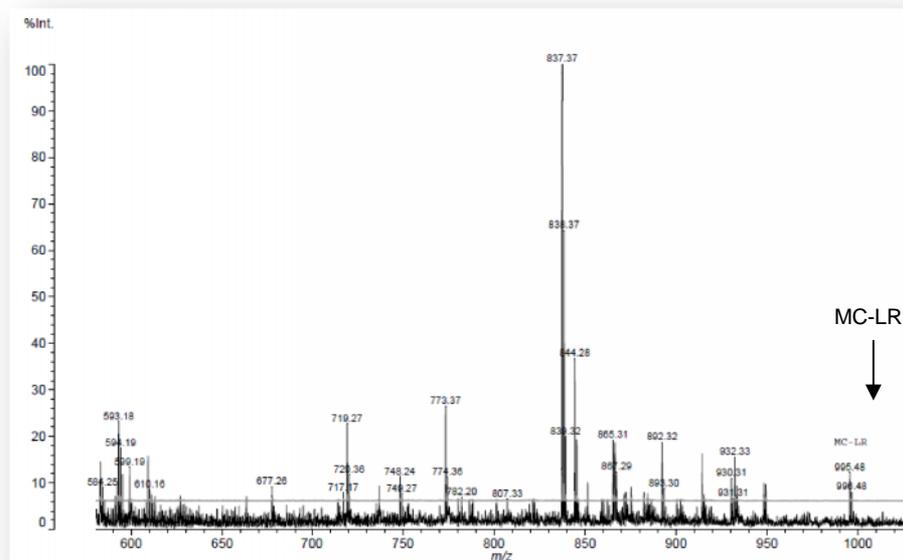


Figura 28 - Resultado de um dos espectros de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco e 1-Out, onde é possível ver a presença de MC-LR a 995,48 m/z.

2.7. Análise por PCR em Tempo Real

A análise por PCR em tempo real (RT-qPCR) foi realizada para detecção e quantificação dos fragmentos dos genes *16S rRNA*, *16S rRNA* específico de *Microcystis spp.*, *mcyA* e *mcyB*. A quantificação foi feita tanto para as amostras ambientais, como para as amostras ambientais com vista à optimização dos volumes amostrados. As “melting curves” das reacções de RT-qPCR encontram-se no anexo IV.

A curva padrão foi feita com base em 6 diluições do DNA da estirpe M6 de *M. aeruginosa*, variando de $1,19 \times 10^6$ células por reacção (céls/reacção) até 1,19 céls/reacção.

O limite mínimo de detecção para os pares de “primers” Micr184F/431R e *mcyB*2959F/3278R foi de 1,19 céls/reacção, e para os pares de “primers” Cya359F/781R e para o *mcyA*-CD1F/1R foi de $1,19 \times 10^1$ céls/reacção. Para estes dois últimos pares de “primers”, para a concentração de 1,19 céls/reacção o produto esperado não foi obtido e formaram-se dímeros de “primers”.

Com base nos valores da quantidade inicial de DNA dos controlos e nos valores de Ct (“threshold cycle”) destes foi possível fazer, para cada reacção, uma regressão linear. Por análise dos “melting peaks” verificou-se a ausência da formação de dímeros de “primers” e que os picos dos produtos foram detectados aos $87 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para o *16S rRNA* e para o fragmento do *16S rRNA* específico de *Microcystis sp.* e $82 \pm 1^\circ\text{C}$ para o *mcyA* e $82 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para o *mcyB*.

A curva padrão foi construída, mantendo-se linear para os logaritmos das concentrações padrão. Os valores relativos às rectas padrão encontram-se sumariados na tabela XI.

Tabela XI - Eficiências e parâmetros da curva padrão da análise de PCR em tempo real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização do volume, para os fragmentos dos genes 16S rRNA, 16S rRNA específico de *Microcystis sp.* (m16S rRNA), *mcyA* e *mcyB*

	Gene alvo	Eficiência (%)	Inclinação da recta	Intercepção com eixo do y	r ²
Amostras ambientais	16S rRNA	86,6	-3,691	37,634	0,997
	16S rRNA (fragmento específico para <i>Microcystis sp.</i>)	88,3	-3,640	33,182	0,998
	<i>mcyA</i>	95,4	-3,436	31,126	0,999
	<i>mcyB</i>	90,9	-3,563	33,149	0,999
Amostras ambientais para optimização do volume	16S rRNA	86,4	-3,697	37,663	0,997
	16S rRNA (fragmento específico para <i>Microcystis sp.</i>)	83,4	-3,797	35,460	0,999
	<i>mcyA</i>	90,4	-3,575	36,282	0,999
	<i>mcyB</i>	85,6	-3,723	37,882	0,998

Todas as eficiências de reacção foram superiores a 85%, confirmando-se uma boa performance.

Através da análise de PCR em tempo real, foi possível determinar o número de cópias de cada gene por mililitro. Considerou-se que em cada genoma existe apenas uma cópia do gene, pelo que cada cópia foi considerada como uma célula, designando-se o valor final em células equivalentes/mL. A quantificação de células equivalentes por mililitro de cianobactérias, *Microcystis spp.*, *mcyA* e *mcyB*, para as amostras ambientais encontram-se nas figuras 29 e 30, respectivamente para o Marco e para o Torrão. A quantificação de células equivalentes para *mcyA* e *mcyB* nem sempre foi possível, devido a uma grande quantidade de dímeros de “primers” que se formaram. Contudo, ainda que não tendo sido possível quantificar, foi possível detectar a presença destes genes em todas as amostras, com excepção da última data de amostragem (29-Out) no Torrão.

De uma maneira geral, a quantidade de células vai diminuindo ao longo do tempo. A quantidade de *Microcystis sp.* em relação ao total de cianobactérias também vai diminuindo, atingindo valores de 1,5% e 0,5% para o Marco e Torrão respectivamente. Na data de 1-Out do Marco, a percentagem de *Microcystis spp.* em relação ao total de cianobactérias é bastante elevada, sendo quase de 50%.

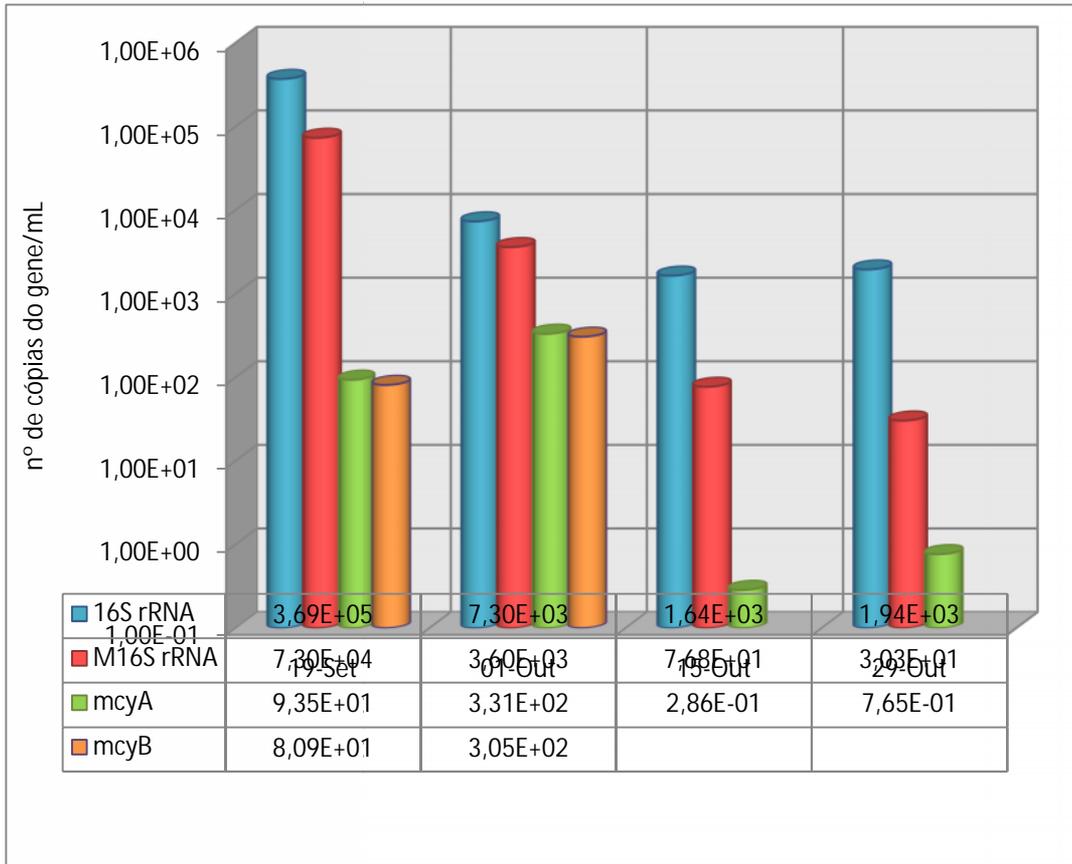


Figura 29 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais do Marco.

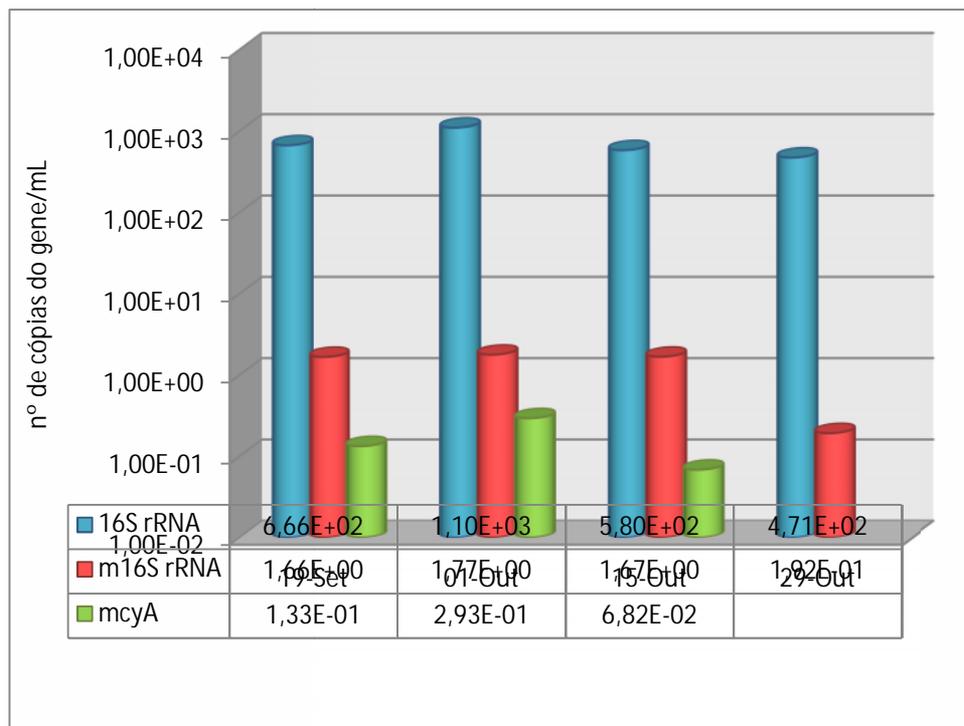


Figura 30 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais do Torrão.

Para as amostras ambientais com vista à optimização do volume de amostragem, verificou-se que os menores volumes amostrados foram os que tiveram maiores quantidades de cópias dos genes (figs.31 e 32). Considerou-se que em cada genoma existe apenas uma cópia do gene, pelo que cada cópia foi considerada como uma célula, designando-se o valor final em células equivalentes/mL. Para o gene *mcyB*, para o volume de 250mL a 19-Set e o maior volume de amostragem a 1-Out não foi possível quantificar o nº de células equivalentes, com base no número de cópias do fragmento do gene *mcyB*. A impossibilidade de quantificação também ocorreu para os genes *mcyA* e *mcyB* nas amostras do Torrão. Este facto deveu-se à grande quantidade de dímeros de “primers” que se formaram, não possibilitando a quantificação contudo, a detecção foi sempre positiva.

Nas amostras do Marco, o número de cópias do gene referente ao fragmento do 16S *rRNA* específico de *Microcystis sp.* foi superior ao número de cópias do fragmento do 16S *rRNA* de cianobactéria.

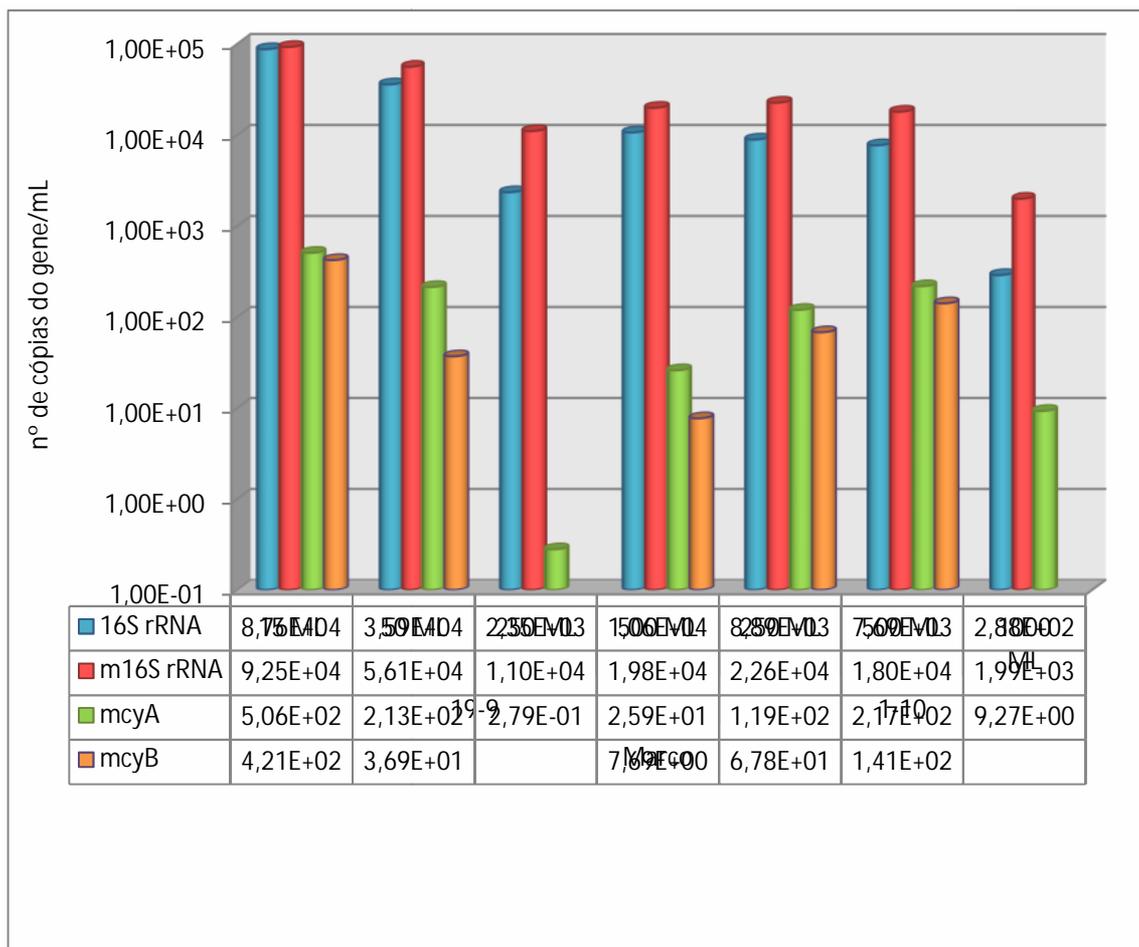


Figura 31 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais com vista à optimização do volume de amostragem, do Marco.

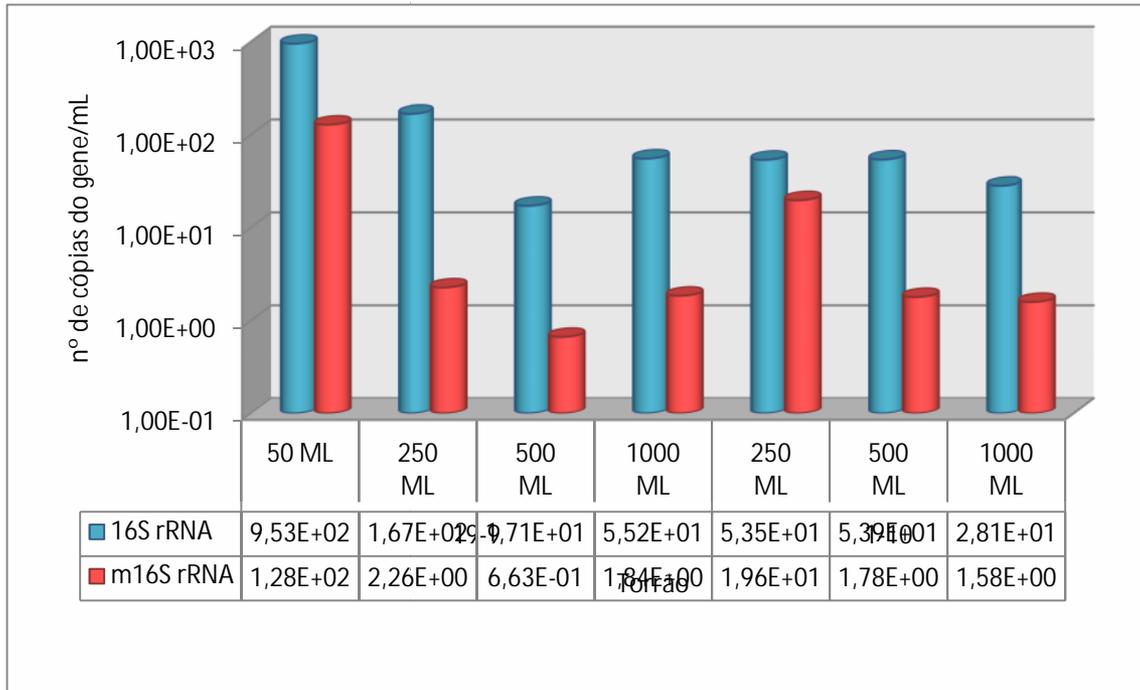


Figura 32 - Quantificação por PCR em tempo real do número de cópias de cada gene/mL para as amostras ambientais com vista à optimização do volume de amostragem, do Torrão

3. Discussão

3.1. Parâmetros físico-químicos, ocorrência, cultura e identificação (fenotípica e genotípica) de cianobactérias

Muitas espécies e estirpes de cianobactérias produzem compostos tóxicos podendo causar problemas em águas recreativas ou em águas para consumo, levando a intoxicações humanas e de outros animais. A exposição a toxinas de cianobactérias pode reflectir-se tanto a nível de morbilidade, como de mortalidade.

A ingestão de água contaminada é a principal via de exposição a cianotoxinas, seguindo-se o uso de lagos e rios para fins recreativos (Falconer e Humpage 2001).

A monitorização de rotina de cianotoxinas deve ser feita preferencialmente em águas para consumo humano. Prever onde e como as florescências de cianobactérias ocorrem é difícil, se não mesmo impossível. A enorme variabilidade na toxicidade de florescências entre diferentes anos, ou até mesmo num único dia, torna complicado a previsão de potenciais riscos (Apeldoorn *et al.* 2007).

Apesar das dinâmicas populacionais, a elevada variabilidade de concentrações de microcistinas nos cursos de água naturais tem sido atribuída a variações das condições naturais, as quais podem influenciar a taxa de produção da toxina (Funari e Testai 2008). Contudo, o papel dos factores ambientais na produção da toxina ainda não é suficientemente conhecido. Alguns estudos mostram que variações em parâmetros como a luz, a idade da cultura, temperatura, pH e nutrientes podem influenciar a produção de microcistina (WHO 1999).

A temperatura da água pode influenciar processos bioquímicos e fisiológicos, afectando a multiplicação do fitoplâncton (Vale 2005). Esta variação está normalmente associada à temperatura do ambiente mas, por exemplo, descargas de efluentes industriais podem igualmente provocar variações significativas (Vale 2005).

A maioria das cianobactérias tem taxas de crescimento máximas a temperaturas próximas dos 25°C (WHO 1999; Oliva-Teles *et al.* 2008). Esta temperatura óptima é superior à das algas verdes e das diatomáceas, explicando assim a sua dominância em períodos mais quentes, como no verão (WHO 1999; Dokulil e Teubner 2000).

Na primeira amostragem, quando foram detectadas as florescências, a temperatura da água rondava esta temperatura óptima. Acompanhando a diminuição da temperatura ambiente, a temperatura da água, ao longo das amostragens foi diminuindo, sendo que,

esta diminuição foi acompanhada de uma diminuição da quantidade de cianobactérias totais.

No trabalho realizado por Oliva-Teles e colaboradores (2008) na albufeira do Torrão, verificou-se a presença de florescências nos meses mais quentes, constatando a importância da temperatura no desenvolvimento destes organismos.

Segundo Prakash e colaboradores (2009), a variante de microcistina predominante está relacionada com as temperaturas onde ocorre. Assim, microcistina-LR é predominante em países temperados, ao passo que microcistina-RR é predominante em países mais quentes. Contudo, a MC-LR costuma aparecer sempre em concentrações consideráveis.

O oxigénio dissolvido é essencial nos processos de degradação da matéria orgânica e na manutenção das comunidades aeróbias (Vale 2005). Naturalmente, o O₂ dissolvido varia de acordo com a temperatura da água e a pressão atmosférica. Contudo, o aumento de matéria orgânica, como a resultante de descargas de efluentes urbanos, ou o aparecimento de florescências pode levar a uma diminuição deste (Vale 2005). Segundo Vale (2005), valores superficiais de saturação de oxigénio inferiores a 40% são considerados indicativos de eutrofização.

No presente trabalho, de 15-Out para 29-Out observou-se um grande aumento da saturação de O₂ (de 74% para 102% no Marco e de 66% para 89% no Torrão), a qual foi acompanhada de uma diminuição de cianobactérias.

O pH, naturalmente, varia de acordo com a natureza da água, do solo e da vegetação marginal (Vale 2005). O solo da região em estudo é essencialmente granítico (Martins 2007), contribuindo para a tendência de um pH ácido na água. Contudo, os valores de pH registados permitem classificar a água como neutra a ligeiramente alcalina. Estes valores são semelhantes aos registados por Vale (2005). Entre os dois locais amostrados não se registaram diferenças apreciáveis.

Valores de pH mais elevados (entre 7,5 a 9) são comuns durante períodos de dominância de cianobactérias, especialmente durante florescências (Martins 2007). Segundo Bobbin e Recknagem (2001), as florescências de *M. aeruginosa* ocorrem em pH alcalinos (pH>8,15). Os maiores valores de pH registados no presente trabalho, correspondem à primeira data de amostragem (19-Set), quando ocorriam florescências de *Microcystis*. Isto ocorre porque grandes densidades de cianobactérias levam a uma diminuição do dióxido de carbono na água, aumentando o pH (Vale 2005). Segundo Dokulil e Teubner (2000), o pH elevado não está directamente associado a um aumento da proliferação de cianobactérias contudo, poderá interferir na manutenção da florescência. Resultados semelhantes foram obtidos por Jaehnichen e colaboradores (2001), que observaram que a produção de microcistinas por *M. aeruginosa* só ocorria na

fase de crescimento exponencial e a pHs superiores a 8,4. Os referidos autores também observaram que a produção da toxina se devia à falta de carbono dissolvido na água e não directamente ao aumento de pH.

O facto de as cianobactérias se desenvolverem melhor em pHs elevados (pH>8,5), confere-lhes vantagem perante os outros grupos, estando este facto relacionado com o aparecimento de florescências em águas eutrofizadas, no final do verão (Oliva-Teles *et al.* 2008).

A condutividade mede a capacidade de uma amostra de água conduzir a corrente eléctrica, sendo dependente da concentração de iões e da temperatura da água (Vale 2005). Em águas doces, a 25°C, segundo Vale (2005), pode variar entre 30 e 2000 µS/cm. A condutividade pode afectar a fixação de azoto pelas cianobactérias. Em solos graníticos, como é o caso, apresenta geralmente valores baixos (Vale 2005).

No presente trabalho, no Marco, não houve grandes variações da condutividade, seguindo uma tendência de ligeiro aumento ao longo das datas, não ultrapassando os 120 µS/cm. No Torrão, a condutividade sofreu alterações, variando entre 135 e 163 µS/cm em 1-Out e 15-Out, respectivamente. A condutividade no Torrão foi sempre superior à determinada no Marco. Vale (2005) verificou um aumento da condutividade no Marco entre Junho e Outubro de 2004, chegando a atingir valores de 151 µS/cm. Os aumentos bruscos da condutividade podem ter impacto nas comunidades fitoplanctónicas, uma vez que originam fenómenos de difusão através da parede celular, podendo provocar a lise das células (Vale 2005). No Marco, acompanhando o aumento da condutividade, Vale (2005) observou uma queda da densidade de fitoplâncton.

Segundo Jaehnichen e colaboradores (2001), os factores abióticos apenas influenciam indirectamente a produção de toxina por *M. aeruginosa*. A produção é controlada pela fase de crescimento, a composição de espécies e a existência de carbono inorgânico dissolvido (Jaehnichen *et al.* 2001).

O desenvolvimento de florescências de *Microcystis* e a produção da toxina devem-se à soma de vários factores (Rinta-Kanto *et al.* 2009).

As cianobactérias têm características particulares, determinantes da sua importância, sucesso e predominância em comunidades fitoplanctónicas (Mankiewicz *et al.* 2003). Contudo, diferentes taxa de cianobactérias podem ter comportamentos diferentes (Mankiewicz *et al.* 2003). As florescências surgem normalmente durante períodos primaveris ou em finais de verão, como é o caso de espécies como a *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Mankiewicz *et al.* 2003).

Martins (2007), num estudo realizado na Albufeira do Torrão, no rio Tâmega, demonstrou que a comunidade fitoplanctónica, nomeadamente no que se refere a cianobactérias tem vindo a aumentar, como consequência da eutrofização.

Em Portugal, estudos demonstram que 50% das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas produzem microcistinas (Saker *et al.* 2005a), pelo que esta cianobactéria é bastante importante em termos de qualidade da água, principalmente quando os cursos da água em que surgem são utilizados para captação de água para consumo ou para fins recreativos (Vasconcelos *et al.* 1995; Vasconcelos *et al.* 1996; Vasconcelos 2001), como é o caso da albufeira do Torrão.

Dados anteriores (Pereira 1998; Vale 2005; Martins 2007) referem ser comum a sucessão de *A. flos-aquae* - *M. aeruginosa* no Marco, tal como foi observado neste trabalho.

Segundo Martins (2007), a comunidade fitoplanctónica do Marco, no verão e no início do outono é dominada por cianobactérias (mais de 90% da densidade total do fitoplâncton). A mesma autora refere que nestes meses a albufeira se encontrava hipereutrofizada.

O ciclo de sucessão *A. flos-aquae* e *M. aeruginosa* também foi observado por Martins (2007), sendo que *M. aeruginosa* foi dominante nos meses mais quentes. Martins (2007) e Vale (2005) justificam esta sucessão através das concentrações de azoto e fósforo. As referidas autoras apontam para que estes dois compostos sejam os responsáveis pelo aparecimento das cianobactérias e pela proliferação de espécies fixadoras de azoto versus as não fixadoras, dependendo do factor limitante.

O exame microscópico de uma florescência é muito útil. A informação obtida relativa às espécies detectadas pode indicar logo uma possível existência de toxinas. Esta informação pode determinar o tipo de ensaio que se deve realizar em seguida para determinar o nível de toxinas.

A maioria das cianobactérias pode ser distinguida do restante fitoplâncton microscopicamente, através das suas características morfológicas. A taxonomia das cianobactérias, seguindo o código de nomenclatura botânica, permite uma diferenciação em género e espécie. Contudo, esta diferenciação é alvo de alguma incerteza e, organismos classificados como pertencendo à mesma espécie podem possuir diferenças genéticas substanciais. Os conhecimentos existentes sobre a regulação da produção das toxinas indicam que a distinção em género é muito importante para determinar o potencial tóxico, mas que, por exemplo, a produção de microcistina varia mais a nível de génotipos ou estirpes, do que a nível de espécies (WHO 1999). Segundo Rinta-Kanto e

colaboradores (2009), numa população natural de *Microcystis*, coexistem várias estirpes, fenotipicamente idênticas, tóxicas e não tóxicas genotipicamente.

A dominância de *Microcystis* observada neste trabalho, nas primeiras datas de amostragem, e a sua persistência nas restantes datas, inferiu para a possibilidade de estar a ser produzida microcistina, sendo que, possivelmente esta seria a principal toxina produzida.

As colónias de *M. wesenbergii*, morfologicamente, distinguem-se das de *M. aeruginosa* pela presença de uma bainha visível (Komarek e Anagnostidis 1998). Tal como no presente trabalho, Otsuka e colaboradores (2000) identificaram vários morfotipos de *M. wesenbergii* em cultura. Segundo o referido autor, as espécies de *Microcystis* alteram as formas das colónias quando em ambiente natural ou em cultura, podendo, em cultura, observar-se colónias diferentes, não descritas em meios naturais. Segundo Via-Ordorika e colaboradores (2004) as variações morfológicas identificadas em cultura são o resultado das condições não naturais a que são expostas.

Os problemas na aplicação de critérios morfológicos na classificação de cianobactérias advém das variações que podem ocorrer em resposta às alterações do ambiente (Otsuka *et al.* 2000). A actual classificação morfológica de *Microcystis* não é suportada pela actual análise filogenética baseada na sequência do gene *16S rRNA* (Otsuka *et al.* 2000).

Os dados genéticos podem, por vezes, estar de acordo com a classificação baseada em características morfológicas contudo, estas diferenças parecem não ser válidas para a classificação a nível da espécie. Segundo Otsuka e colaboradores (1998), através da sequência do *16S rRNA* de várias estirpes de diferentes espécies de *Microcystis*, não detectaram diferenças, sendo que em muitos casos, a percentagem de similaridade era de 100% entre diferentes morfoespécies. Os resultados obtidos pelos referidos autores demonstraram que diferentes fenótipos de *Microcystis* não reflectem necessariamente a sua filogenia, sendo necessária a reconstrução da taxonomia a nível da espécie (Otsuka *et al.* 1998). Assim, a classificação morfológica do género *Microcystis* deve ser revista, com a percepção de que uma mesma estirpe pode ter variadas formas de colónias e que muitas das variações morfológicas devem ser assumidas como variações fenotípicas ou intraespecíficas.

As características morfológicas podem providenciar informações importantes referentes a organismos de interesse; contudo, é necessário ter em atenção de que os organismos não podem ser somente classificados com base nas características morfológicas. A taxonomia botânica de *Microcystis* apresenta assim algumas limitações, sendo que, a taxonomia bacteriológica poderá ser importante para resolver esta situação.

Percentagens de similaridade superiores a 70% são suficientes para classificar esses organismos como pertencentes à mesma espécie (Otsuka *et al.* 2001). Otsuka e colaboradores (2001) e Kondo e colaboradores (2000) referem que as morfoespécies *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii* e *M. viridis*, uma vez que a percentagem de similaridade referente ao 16S *rRNA* é sempre superior a 70%, devem ser todas consideradas como uma só espécie, de acordo com o Código de Nomenclatura Bacteriológico.

No presente trabalho, por análise do 16S *rRNA*, das 16 estirpes classificadas como pertencendo ao género *Microcystis*, não foi possível discernir entre *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii*, chegando, por exemplo, a estirpe 12 a ter 100% de similaridade com estirpes das duas espécies (tabela IV). Estes resultados de similaridade baseiam-se em sequências de genes colocados por qualquer autor na base de dados do Blast (NCBI), tendo-se partido do pressuposto de que as espécies tinham sido classificadas correctamente pelos respectivos autores, antes de terem sido inseridas as informações na base de dados. Mas, uma vez que não houve acesso às estirpes, não podemos ter a certeza sobre a correcta classificação, podendo uma estirpe, classificada na base de dados como *M. wesenbergii*, ser na realidade *M. aeruginosa*, ou vice-versa. Assim, a distinção entre *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii*, no presente trabalho, baseou-se nas características morfológicas (presença ou ausência de bainha visível), tendo servido a análise genotípica para a confirmação do género. Com base na análise morfo e genotípica, *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii* foram consideradas como diferentes morfoespécies, e não diferentes espécies.

Para além das estirpes de *Microcystis*, foram também detectadas por análise genotípica do 16S *rRNA*, *A. flos-aquae* e *Limnothrix sp.* A sequenciação de mais estirpes de *A. flos-aquae* não foi possível devido à dificuldade de isolamento e cultura destes organismos. A *A. flos-aquae* está descrita como produtora de cilindrospermopsina, saxitoxina (WHO 1999), anatoxina-a (Carmichael 1992) e PSP (paralytic shellfish poisoning) (Vasconcelos 1999). A produção de PSP por *A. flos-aquae* já foi detectada no rio Douro (Vasconcelos 1999). Assim, uma vez que esta espécie tem elevada ocorrência na albufeira do Torrão, será importante, em trabalhos futuros, verificar a presença de outro tipo de toxinas neste local, como as saxitoxina, anatoxina-a e PSP.

O género *Limnothrix*, com base na pesquisa bibliográfica efectuada, até à data não tinha sido detectada na albufeira, nem se encontra descrita como produtora de toxinas. Espécies pertencentes a este género já foram reportadas como dominantes em rios eutrofizados (Gkelis *et al.* 2005).

3.2. Amostras ambientais

Em albufeiras utilizadas para captação de águas para consumo e para fins recreativos, como é o caso da albufeira do Torrão, têm sido reportados o aparecimento de fluorescências tóxicas de cianobactérias (Vasconcelos *et al.* 1996; Saker *et al.* 2005a).

A aplicação de técnicas de biologia molecular na detecção de cianobactérias toxigénicas tem como vantagem a capacidade de identificar constituintes microbianos dentro de populações naturais complexas, baseando-se unicamente em sequências de ácidos nucleicos, permitindo identificar espécies potencialmente produtoras de toxinas. A rapidez, baixos custos e sensibilidade destes métodos torna-os ideais para estudos de fisiologia microbiana e ecologia (Pearson e Neilan 2008). Além destas vantagens, permite a análise das amostras sem a necessidade do cultivo dos organismos (Ouellette e Wilhelm 2003).

A técnica de PCR baseia-se no uso de “primers” (iniciadores) complementares de porções de DNA de interesse, sendo a replicação feita por uma DNA polimerase termoestável. O resultado é a amplificação exponencial de um fragmento genético de interesse.

Por PCR foi detectada a presença de cianobactérias (fragmento do *16S rRNA* específico de cianobactérias), *Microcystis spp.* (fragmento do *16S rRNA* específico de *Microcystis spp.*) em todas as datas, e de genes envolvidos na produção de microcistina (*mcyA*, *mcyB* e *mcyE*) e na produção de microcistina/nodularina (fragmento HEP) para algumas datas.

A capacidade de identificar espécies toxigénicas, como em *M. aeruginosa*, baseada na análise de sequências de genes como o da microcistina sintetase, tem sido abordada em vários estudos. Jungblut e Neilan (2006) sugerem uma evolução convergente das várias espécies de cianobactérias e das microcistinas sintetases, indicando que estes genes em espécies produtoras de microcistinas têm uma elevada relação filogenética (Saker *et al.* 2005b). O género *Microcystis* é um dos vários que se conhece como produtores de microcistinas. O uso das técnicas moleculares deste trabalho além de permitir identificar estirpes de *Microcystis* potencialmente produtoras de microcistina, por amplificação com o “primer” para o fragmento do gene *mcyB*, permitiu igualmente detectar a presença de outros géneros de cianobactérias produtoras de microcistinas, incluindo *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, entre outros, através da amplificação com o “primer” para o fragmento do gene *mcyA*.

Segundo Ouahid e colaboradores (2005) a realização de uma análise de PCR com o maior número possível de “primers” para diversos genes *mcy*, permite um melhor critério para inferir sobre o potencial tóxico da amostra ou estirpe em estudo. Contudo, não é

suficiente para garantir que esteja a ocorrer a produção da toxina. Kurmayer e colaboradores (2004), num estudo feito com *Planktothrix rubescens* e *P. agardhii*, detectaram a presença de todo o cluster *mcy*, sem que tenha havido a produção de toxina. Apesar desta limitação, estes métodos podem ser bastante úteis para alerta da possível existência de toxinas em águas, de modo rápido e simples. No presente trabalho, foram amplificadas sequências relativas a 4 fragmentos dos genes da microcistina sintetase, com este objectivo. Para além do *mcyA* e do *mcyB*, também foi escolhido amplificar um fragmento do gene *mcyE*, que codifica uma região para a cadeia ADDA. O fragmento HEP, também amplificado no presente trabalho, amplifica uma região que codifica a enzima aminotransferase do gene *mcyE* de microcistinas, assim como uma região da nodularina sintetase do gene *ndaF*.

No presente trabalho, as técnicas moleculares (PCR e RT-qPCR) mostraram ser úteis na detecção de organismos e genes envolvidos na biossíntese de microcistina para a determinação do potencial tóxico de estirpes isoladas. Técnicas semelhantes têm sido usadas na identificação de estirpes de cianobactérias produtoras de toxinas em amostras fitoplanctónicas (Baker *et al.* 2002; Foulds *et al.* 2002; Bittencourt-Oliveira 2003; Fergusson e Saint 2003; Hisbergues *et al.* 2003; Kurmayer e Kutzenberger 2003; Via-Ordorika *et al.* 2004; Rinta-Kanto *et al.* 2005; Saker *et al.* 2005a; Valério *et al.* 2005; Anjos *et al.* 2006; Boaru *et al.* 2006; Furukawa *et al.* 2006; Preußel *et al.* 2006; Rantala *et al.* 2006; Gobler *et al.* 2007; Izaguirre *et al.* 2007; Mitsuhiro Yoshida *et al.* 2007; Saker *et al.* 2007a; Yoshida *et al.* 2007; Hotta *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008; Rinta-Kanto *et al.* 2009).

Comparando os resultados obtidos por PCR convencional e RT-qPCR, para os genes *mcyA* e *mcyB*, a segunda técnica mostrou ser mais sensível, uma vez que, embora nem sempre quantificável, foi possível determinar a presença dos genes num maior número de datas. A amplificação para o gene *mcyA* para todas as datas e locais foi de 62,5% por PCR convencional e de 100% por RT-qPCR. Para o gene *mcyB* foi de 25% e 87,5% respectivamente. A técnica de RT-qPCR tem ainda como vantagem permitir a quantificação.

A técnica de RT-qPCR tem sido aplicada com sucesso na quantificação de genótipos produtores de microcistinas em populações naturais (Kurmayer e Kutzenberger 2003; Rinta-Kanto *et al.* 2005; Yoshida *et al.* 2007; Rinta-Kanto *et al.* 2009), permitindo quantificar os níveis de DNA alvo inicialmente presentes na amostra, calculada pela taxa de ampicões que se vão acumulando, por geração de um sinal fluorescente durante o processo de amplificação. Para tal, é determinado um “threshold cycle” (Ct), o número de ciclos de PCR ao fim do qual a fluorescência ultrapassa um determinado limiar, podendo ser usado para determinar a quantidade inicial de DNA na amostra, com base numa curva padrão (construída a partir de amostras de concentração conhecida) (Foulds *et al.*

2002; Kurmayer e Kutzenberger 2003). Os valores de Ct providenciam uma informação quantitativa que relaciona directamente o número de cópias dos ácidos nucleicos por amostra (Foulds *et al.* 2002).

No Marco, por RT-qPCR, o número de cianobactérias e *Microcystis* diminuiu bastante ao longo das datas. No Torrão, os valores de células eram bem menores mas, mais constantes ao longo do tempo. A quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas é importante uma vez que estes organismos apenas se tornam problemáticos quando ocorrem em concentrações de milhares de células por mililitro (Rasmussen *et al.* 2008b). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO 2003) valores de 20000 céls/mL de cianobactérias em águas recreativas, acarreta um risco baixo com efeitos adversos a curto prazo, como irritações dérmicas ou doenças gastrointestinais. Um risco moderado, com efeitos adversos a curto prazo, e a possibilidade de efeitos adversos a longo prazo (dependendo das espécies presentes), observa-se para valores de cianobactérias superiores a 100000 céls/mL. A possibilidade de intoxicações agudas e efeitos adversos a longo prazo, representam graus de risco elevados, em locais onde haja a formação de espuma e haja risco de contacto directo, inalação ou ingestão da água. A concentração de cianobactérias determinadas por RT-qPCR a 19-Set no Marco foi mais de três vezes superior às 100000 céls/mL, verificando-se ainda a formação de espuma.

O número de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas (*mcyA*) atingiu um máximo, em ambos os locais a 1-Out, apesar de nesta data os valores de cianobactérias e *Microcystis* serem menores. Espécies de *Microcystis* potencialmente produtoras de microcistinas foram determinados através de amplificação do gene *mcyB*, cujo “primer” utilizado amplifica uma região do 16S *rRNA* específica desta espécie. Os valores para *mcyB* só permitiram a quantificação no Marco e nas duas primeiras datas de amostragem. Um aumento da primeira para a segunda data de amostragem foi evidente, sendo claramente similar ao aumento de *mcyA*. Por comparação das quantidades de células de *Microcystis* e de genótipos de *Microcystis* produtores de microcistinas (*mcyB*), verifica-se a coexistência de genótipos produtores e não produtores da toxina. Rinta-Kanto e colaboradores (2009), num estudo realizado num lago da América do Norte, verificaram que a proporção de genótipos de *Microcystis* produtores/não produtores de microcistinas não excedia os 8%. Kurmayer e colaboradores (2003) em lagos da Alemanha detectaram variações na proporção entre 1,7% e 71% e Yoshida e colaboradores (2007) num lago do Japão determinaram valores de genótipos tóxicos em relação ao total de *Microcystis* de 0,5% a 35%. No presente trabalho os valores máximos determinados de genótipos produtores em relação a não produtores, em *Microcystis* foi de 9,25%. A proporção de genótipos produtores de microcistinas em cianobactérias,

relativamente à quantidade total de cianobactérias variou entre 0,01% e 4,53% no Torrão a 15-Out e no Marco a 1-Out, respectivamente.

No Marco, a abundância de *Microcystis* aumentou da primeira para a segunda data de amostragem. Apesar da diminuição do número total de cianobactérias, a percentagem de *Microcystis* foi quase de 50%. Nas últimas datas, a abundância relativa deste género diminuiu bastante. A percentagem de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas e de *Microcystis* potencialmente tóxicas aumentou da primeira para a segunda data, representando quase 10% da população total de *Microcystis*. Na última data de amostragem ocorre um ligeiro aumento da abundância relativa de cianobactérias produtoras de microcistina, a qual não é acompanhada por um aumento da percentagem de *Microcystis* ou de *Microcystis* potencialmente tóxicas, sugerindo o aparecimento de outras espécies tóxicas. No Torrão, a abundância de *Microcystis* foi menos variável, revelando que esta espécie representa apenas uma pequena percentagem do número total de cianobactérias. Neste local, na segunda data de amostragem houve um ligeiro aumento da quantidade de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas. O número de *Microcystis* potencialmente tóxicas não pôde ser determinado em nenhuma das datas, possivelmente devido às reduzidas quantidades de *Microcystis*.

Os resultados demonstram a existência de uma grande quantidade de cianobactérias no Marco, o qual, juntamente com a quantidade de *Microcystis spp.* foram diminuindo bastante desde o final do verão até meados do outono de 2008. A variação da percentagem relativa de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas acompanhou a variação da abundância relativa de *Microcystis* e de *Microcystis* potencialmente produtoras de microcistinas.

Por métodos moleculares, foi possível verificar que diferentes locais da mesma albufeira demonstraram ter diferentes padrões de variação da abundância de cianobactérias e de *Microcystis* ao longo do tempo. Este facto pode ser explicado pela capacidade que as cianobactérias possuem em alterar a sua concentração e posição nos cursos de água em períodos de tempo muito reduzidos, tendo já sido observados resultados semelhantes por outros autores (Moreno *et al.* 2003; 2004).

Os resultados obtidos para as amostras ambientais por RT-qPCR apontam para que esta técnica possa ser usada para inferir sobre o potencial toxigénico de uma amostra natural. Contudo, estes resultados não reflectem directamente as concentrações de microcistina pois, a produção da toxina varia com o estado fisiológico das células e as condições ambientais (Furukawa *et al.* 2006).

Por análise do conteúdo tóxico das amostras, por ELISA, foi possível observar uma variação temporal e espacial. O local de amostragem do Marco apresentou maior concentração de microcistina em relação ao Torrão, sendo que, para os dois locais, nas

últimas datas, a quantidade de toxina foi diminuindo. Estas alterações podem estar relacionadas com as características dos locais em estudo e das variantes ambientais ou dever-se ao facto de as concentrações destes organismos estarem a diminuir. Os maiores valores de toxina ocorreram no Marco a 1-Out. Para o Torrão, foram igualmente determinados os maiores valores de MC-LR equivalente/mL na mesma data, ainda que estes valores sejam bem menores que no Marco. A 1-Out foram determinadas as maiores concentrações de céls equivalentes/mL com os genes *mcyA* e *mcyB* por RT-qPCR, mostrando a existência de uma boa relação entre os dois métodos. Por PCR convencional, nas duas primeiras datas no Marco, foram detectados todos os genes pesquisados envolvidos na produção da toxina. No Torrão, nas referidas datas, o *mcyB* foi detectado mas apenas por RT-qPCR. Assim, confirma-se igualmente a necessidade e a importância de se pesquisar vários genes do cluster *mcy* para inferir sobre a possível presença da toxina. Nas restantes datas do Marco e a 15-Out no Torrão, foram detectados os genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyE* sem que se tenha detectado a toxina, confirmando que a toxina não é sempre produzida quando ocorrem os genes. A 29-Out no Torrão o gene *mcyB* não foi detectado, assim como a toxina. Outros estudos têm igualmente detectado uma relação entre os métodos moleculares e a quantificação da toxina. Boaru (2006) encontrou uma relação entre a presença dos genes *mcyA* e *mcyB* (analisado por PCR) e a presença de toxina (determinada por ELISA) em amostras ambientais de rios da Roménia. Em lagos na Finlândia, Vaitomaa e colaboradores (2003) detectaram uma relação, na maioria dos casos entre o número de cópias do gene *mcyE* (determinado por RT-qPCR) e o conteúdo de microcistinas.

O conteúdo de microcistinas não pode ser relacionado com a biomassa de géneros de cianobactérias potencialmente produtores de toxinas (Dittmann e Börner 2005). Dois factores podem contribuir para as flutuações no conteúdo de microcistinas em amostras naturais, a curto e longo prazo. Em primeiro, factores ambientais podem ter impacto nas taxas de produção de microcistina celular e, em segundo, as variações nas concentrações de microcistinas detectados podem ser o resultado de alterações nas dinâmicas populacionais que levam a variações na proporção de genótipos tóxicos dentro das populações de cianobactérias (Dittmann e Börner 2005).

Quesada e colaboradores (2004) realizaram um estudo sobre a ocorrência de cianobactérias em Espanha, verificando o aparecimento de cianobactérias potencialmente tóxicas por todo o país, sendo que estes organismos dominam as comunidades fitoplânctónicas em pelo menos uma época do ano. Dados bibliográficos descritos neste trabalho, relativos à Europa, demonstram que cerca de 70% das amostras potencialmente tóxicas, são tóxicas (Quesada *et al.* 2004).

As microcistinas encontram-se maioritariamente no interior das células, sendo libertadas aquando da morte celular. Assim, no momento de ocorrência de uma fluorescência de cianobactérias a toxina estará presente tanto na água (toxina extracelular, livre ou dissolvida) e nas células das cianobactérias (intracelular) (Apeldoorn *et al.* 2007). No presente trabalho foram determinados estes dois valores de microcistina por cada data. Em quase todas as datas amostradas, a quantidade de toxina livre foi abaixo do limite de detecção deste método, pelo que se considera que a toxina se encontrava quase a 100% no interior das células. A única excepção foi na data de 1-Out, no Torrão, em que 16% da toxina já se encontrava dispersa no meio. Estes valores apontam para que as cianobactérias estivessem a entrar num estado de senescência, havendo libertação da toxina para o ambiente. Por RT-qPCR verificou-se que de 1-Out para 15-Out, no Torrão, ocorre uma diminuição da quantidade total das cianobactérias. A quase inexistência de toxina dispersa no meio na albufeira do Torrão tem sido observada noutros trabalhos. Nas amostragens realizadas entre Setembro e Outubro, Vale (2005) não detectou toxina dispersa no meio, sendo que os valores que detectou correspondiam sempre a toxina no interior das células. Pereira (1998) não detectou microcistina dispersa na água contudo, nas células os valores máximos detectados foram de 0,95 µg/L.

A quantidade de toxina determinada a 1-Out no Marco foi bastante elevada (10,62 µg/L). Vale (2005) determinou valores máximos de toxina total entre os meses de Junho e Agosto na albufeira do Torrão. Entre Setembro e Outubro, a referida autora apenas verificou valores de 0,2 µg/L. Martins (2007) detectou valores de concentração de microcistinas totais de 1,4 a 142,5 µg MC-LR/L.

Os valores detectados neste trabalho e os observados na bibliografia apontam para um agravamento da situação, uma vez que a toxina parece estar a persistir por um maior número de meses, não se restringindo apenas aos meses de verão. Vasconcelos (1994) e Oudra e colaboradores (2001) já tinham observado, em cursos de água naturais de Portugal e Marrocos, respectivamente, que a ocorrência de cianobactéria e toxinas não era confinado aos meses de verão.

O valor limite de microcistinas-LR na legislação Portuguesa, para águas para consumo, é de 1µg/L. O NHMRC (National Health and Medical Research Council), pertencente ao governo australiano (NHMRC, 2008) propõe um valor guia de um máximo de 10µg/L de microcistinas totais em águas recreativas. A derivação deste valor teve por base os valores guia de concentração de cianobactérias em águas recreativas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003). As concentrações detectadas por ELISA no presente trabalho foram, no Marco a 1-Out, cerca de 10 vezes superior aos legislados e semelhantes aos referidos pela OMS para águas recreativas.

Os níveis de microcistina observados podem ter relevância ecológica para o rio Tâmega, até porque vários estudos têm provado que quantidades de microcistina dissolvida de apenas 1 µg/L são suficientes para reduzir o crescimento de espécies heterotróficas e afectar negativamente a actividade microbiana, alterando a viabilidade alimentar de protozoários e metazoários, ainda que temporariamente (Moreno *et al.* 2003). Assim, as consequências ecológicas das toxinas das cianobactérias são a diminuição do crescimento de organismos bacterianos, redução do potencial crescimento do zooplâncton, incapacidade de espécies mais sensíveis se desenvolverem e acumulação de toxinas ao longo da cadeia trófica (Moreno *et al.* 2003).

A quantificação de toxinas por ELISA é simples e rápida de executar, providenciando uma estimativa da quantidade de microcistinas com um processamento mínimo de amostra. Nem todas as toxinas têm a mesma afinidade para os anticorpos assim, a quantificação por ELISA está dependente da capacidade dos anticorpos reconhecerem as variantes de microcistina presentes na amostra (McElhiney e Lawton 2005). Os testes comerciais de ELISA têm demonstrado a ocorrência de reacções cruzadas, sendo apenas capazes de determinar a toxina em termos de MC-LR equivalentes, podendo, por vezes, a quantidade de toxina ser subestimada para algumas variantes (An e Carmichael 1994).

O teste de ELISA mede a concentração total de toxina numa dada amostra. Recorrendo a HPLC-DAD é possível discernir entre diferentes isoformas de microcistinas com base no seu tempo de retenção e nas características do espectro de absorção UV (Rapala *et al.* 2002; Apeldoorn *et al.* 2007). O comprimento de absorção UV a 238 nm, característico das microcistinas e nodularinas deve-se ao aminoácido ADDA, permitindo a análise das toxinas por HPLC (Msagati *et al.* 2006; Sangolkar *et al.* 2006). A maioria das microcistinas têm um máximo de absorvância a 238 nm, mas algumas variantes com aminoácidos aromáticos, como a microcistina-LW, que possui triptofano, têm um máximo de absorvância a 222 nm (Msagati *et al.* 2006; Sangolkar *et al.* 2006).

No presente trabalho, por HPLC não foi possível detectar ou quantificar as microcistinas. Esta ausência, quando comparada com o ensaio de ELISA, pode-se dever ao facto de os limites de detecção de microcistinas por HPLC serem relativamente elevados (1000 vezes superiores aos de ELISA).

Outro inconveniente deste método deve-se à necessidade do uso de padrões da toxina, os quais apenas existem para um pequeno número de isoformas, além do preço elevado e dos volumes reduzidos que são comercializados (Rapala *et al.* 2002; Apeldoorn *et al.* 2007). Assim, devido à ausência de padrões das diferentes variantes de microcistinas, os resultados são expressos em MC-LR equivalente (McElhiney e Lawton 2005; Sangolkar *et al.* 2006). Este método é igualmente tecnicamente bastante exigente,

pois necessita de vários passos de processamento e análise em laboratório, os quais são extremamente morosos.

Uma vez que o método de ELISA é fácil de executar e os seus limites de detecção se encontram dentro dos necessários por lei para quantificação, deve ser encarado como um possível método para implementação em monitorizações de rotina, tanto em águas recreativas, como nas para captação para consumo humano (Rapala *et al.* 2002). Contudo, devido à impossibilidade de discernir entre diferentes variantes de microcistina, este método não pode substituir o método de HPLC-DAD.

Por espectrometria de massa, como MALDI-TOF MS, é possível uma detecção mais sensível e uma identificação mais precisa das variantes de microcistina presentes, mesmo quando a quantidade de microcistina é bastante reduzida. Este método providencia a massa molecular de todos os péptidos da amostra permitindo uma identificação das diferentes variantes de microcistinas presentes. A principal desvantagem deste método reside no facto de não ser possível a quantificação (WHO 1999). Quando aliada a técnicas como ELISA, o MALDI-TOF MS pode ser bastante importante, podendo ser usado para confirmar a presença de microcistinas e quais as variantes presentes.

A análise de MALDI-TOF MS não estava prevista realizar no início do trabalho, pelo que, no momento de mostragem não foi recolhido nenhum volume com este propósito nem as amostras foram logo liofilizadas com vista a que não ocorresse qualquer degradação da toxina até posterior análise. Assim, a amostra liofilizada para MALDI-TOF MS foi o volume que tinha restado da análise de ELISA. Estas amostras já tinham cerca de 6 meses, foram várias vezes congeladas e descongeladas e mantidas à luz durante longos períodos. Uma vez que se tratava de uma amostra natural, na própria água também poderiam surgir constituintes que potenciasses a degradação da toxina. Segundo Dawson (1998), em condições de laboratório, amostras ambientais com níveis de MC-LR de cerca de 10µg/L sofrem degradação da toxina em menos de uma semana (Dawson 1998). Para além destes factores, a quantidade extremamente reduzida de amostra liofilizada, pode ter contribuído para os resultados negativos de microcistina na maioria das amostras. Assim, apesar de só no Marco a 1-Out se ter detectado a presença de microcistina-LR, não se pode considerar, no presente trabalho, que nas restantes datas e locais esta toxina, ou outras variantes não pudessem também ocorrer. De futuro, será aconselhado que seja recolhido um volume de amostra e devidamente acondicionada com este propósito, mesmo que depois a análise não seja efectuada.

Em amostras naturais, Vasconcelos e colaboradores (1996), verificaram que a variante de microcistinas mais comum em cursos de água portugueses era a microcistina-LR, variando no conteúdo total de microcistinas entre 45,5% a 99,8%. Além

destas variantes também detectaram as variantes -YR, -RR, e [D-Asp³]MC-LR. No Marco, a 1-Out, por MALDI-TOF MS, para além de MC-LR, também foram identificados aeruginosamida, anabaenopeptina A e F e microviridina. Segundo Saker e colaboradores (2005b), estirpes que produzem microcistinas não produzem anabaenopeptinas nem aeruginosamidas. Assim, o facto de estarem todos estes péptidos a serem produzidos na amostra natural do Marco aponta para que sejam diferentes estirpes a produzi-los.

A espécie *Aphanizomenon flos-aquae* foi identificada nesta albufeira, já tendo sido descrita como produtora de cilindrospermopsina (Preußel *et al.* 2006). Assim, apesar de não se ter identificado, nem por análise microscópica, nem por PCR a presença da espécie *C. raciborskii*, poderia estar a ser produzida a toxina nesta albufeira. Contudo, a inexistência de amplificação dos fragmentos PS e PKS da cilindrospermopsina apontam para que não esteja a ser produzida esta toxina neste local. A ausência desta toxina foi confirmada por ensaio imunológico ELISA, em que todos os resultados foram negativos, encontrando-se de acordo com os esperados de acordo com os resultados de PCR convencional.

3.3. Amostras ambientais para optimização do volume de amostragem

Para as amostras do Marco, por PCR convencional, não se verificou qualquer variação nos resultados, que dependesse do volume amostrado.

No Torrão, para o gene *mcyE* e para o fragmento HEP, a 19-Set, só para o menor volume amostrado é que foi obtida amplificação. Possivelmente estes genes não existiam em grandes quantidades na amostra inicial e, aliado ao facto de que num maior volume de uma amostra ambiental, maior é o número de contaminantes e factores ambientais que podem interferir com a reacção de PCR, poderão explicar porque é que a amplificação só ocorreu para os menores volumes. Esta inibição pode ocorrer a três níveis: os inibidores podem impedir a exposição ao DNA alvo, podem causar a degradação do DNA ou inibir a actividade da polimerase (Baker *et al.* 2001; Hisbergues *et al.* 2003). Os ácidos húmicos são os inibidores ambientais mais comumente reportados nas amostras, tendo-se já verificado que inibem a actividade da *Taq* polimerase na reacção de PCR (Baker *et al.* 2001). Com vista à melhoria dos resultados na análise de PCR e para diminuir os efeitos ambientais, foi adicionado à reacção BSA (bovine serum albumin), o qual se liga aos inibidores, não possibilitando que estes interfiram na reacção (Hisbergues *et al.* 2003; Ouellette *et al.* 2006). Furukawa refere igualmente que a existência de uma grande quantidade de pigmentos fotossintéticos pode inibir as reacções de PCR (Furukawa *et al.* 2006).

Na data de 1-Out, também no Torrão, para o gene *mcyE*, a amplificação foi confirmada para o menor e para o maior volume, mas não para o volume de amostragem intermédio (500mL). As amostras naturais de água não são homogêneas e, colheitas, ainda que simultâneas, não são cópias umas das outras, pelo que pode ter ocorrido que, para o volume de 500 mL, se tenha retirado uma amostra com menor quantidade de cianobactérias, não ocorrendo nenhuma estirpe com este gene, ou apenas em ínfimas quantidades, ou a amostra poderia ter uma maior quantidade de contaminantes ambientais, sendo que as quantidades de BSA adicionadas à reacção não foram suficientes para contrariar os efeitos negativos provocados por estes componentes na reacção.

Por RT-qPCR foi possível observar que as amostras do Marco apresentaram maior número de células de cianobactérias equivalente por mililitro do que as amostras do Torrão, nas duas datas amostradas. A 1-Out, no Torrão, a quantidade de células de cianobactérias já era bastante reduzido, sendo que, o volume amostrado não parece ter interferido muito nos resultados. Estes resultados apontam para que quanto mais límpida a água, menos interfere o volume de amostragem nos resultados. A escolha de menores volumes torna-se importante essencialmente quando existe uma grande quantidade de células por mililitro.

O maior volume amostrado não foi necessariamente aquele em que se obteve menores quantificações. Por exemplo, a 19-Set no Marco, o número de células com o gene *mcyA* para o volume de 250 mL foi inferior ao da amostra de 500 mL. Para o mesmo local e data, o gene *mcyB* foi quantificado para os volumes de 15 mL, 50 mL e 500 mL, mas, no volume de amostragem de 250 mL só foi possível a detecção. Tal como na análise de PCR convencional, factores ambientais podem ter interferido nestes resultados, até porque na análise de PCR em tempo real não foi adicionada à reacção BSA.

O limite de detecção na análise de RT-qPCR foi extremamente baixo, tendo este método mostrado ser mais sensível que o PCR convencional para a detecção de genes envolvidos na produção da toxina. Por exemplo, por RT-qPCR não foi possível quantificar o gene *mcyB* no Torrão contudo, ele foi detectado por análise dos “melting peaks”, ao passo de que por PCR convencional não tinha sido detectado o gene em nenhum dos volumes amostrados, para nenhuma das datas.

Embora a técnica de PCR em tempo real seja cada vez mais aceite como um instrumento para analisar a composição de comunidades de cianobactérias, um dos principais problemas deste método reside na dificuldade de converter as quantidades de genes em quantidades de células que possuem esses genes, podendo conduzir a resultados erróneos de enumeração de quantidades de células em amostras naturais.

Por RT-qPCR foram quantificadas, no Marco, maior número de cópias para o fragmento do *16S rRNA* específico de *Microcystis sp.*, do que para o fragmento do *16S rRNA* comum a todas as cianobactérias. Com base nestes valores, à partida, seria de concluir que havia um maior número de células de *Microcystis* do que de cianobactérias. Resultados semelhantes foram obtidos, igualmente em amostras naturais, para Rinta-Kanto e colaboradores (2009), Kurmayer e Kutzenberger (2003) e Rasmussen e colaboradores (2008a). Estes resultados podem dever-se ao uso do *16S rRNA* como alvo, tanto para a quantificação de cianobactérias, como de *Microcystis*, devido ao facto de poderem existir até 4 cópias deste operão no genoma (Rinta-Kanto *et al.* 2005; Rinta-Kanto *et al.* 2009), ou ainda a uma má contagem de células dos controlos ou à persistência de DNA alvo de células mortas em amostras naturais (Rasmussen *et al.* 2008a). Com base na existência de várias cópias do gene *16S rRNA*, qualquer estimativa da densidade celular pode inferir erro na análise de RT-qPCR. Assim, com vista a melhorar este tipo de análise, em trabalhos futuros, deve-se recorrer à amplificação de genes mais conservados, com apenas uma cópia por genoma, como é o caso das regiões conservadas *ITS* (internal transcribed space) entre os genes *16S rRNA* e *23S rRNA* (Iteman *et al.* 2000; Dittmann e Börner 2005) e do *mcyD* (Rinta-Kanto *et al.* 2005). No presente trabalho, observou-se que o limite de detecção para a reacção para amplificação do fragmento do *16S rRNA* específico de *Microcystis sp.*, foi menor que o para o fragmento do *16S rRNA* partilhado por todas as cianobactérias. Estes valores indicam que provavelmente a reacção está mais optimizada para o m $16S rRNA$ que para o *16S rRNA*. O facto da reacção não estar tão bem optimizada, pode explicar os menores valores de quantificação.

Por análise de ELISA, nas duas datas (15-Out e 29-Out), para nenhum dos volumes amostrados foi detectada a toxina, não sendo possível inferir sobre a interferência do volume nos resultados.

3.4. Estirpes isoladas

A purificação e cultura de cianobactérias pode ser difícil e morosa, sendo mais facilmente cultivadas quando acompanhadas por bactérias heterotróficas (Nubel *et al.* 1997). Assim, as culturas obtidas no presente trabalho foram puras mas não axénicas.

A quantidade de microcistina produzida por uma determinada população de cianobactérias em cultura é directamente proporcional à taxa de crescimento da cultura, sendo que a maior produção ocorre na etapa final da fase de crescimento exponencial (Funari e Testai 2008). Assim, a extracção de amostra para ELISA e MALDI-TOF MS foi feita durante a fase de crescimento exponencial.

Microscopicamente não é possível discernir entre estirpes tóxicas e não tóxicas (WHO 1999; Baker *et al.* 2002; Dittmann e Wiegand 2006). Diferentes estirpes de uma mesma espécie podem ser morfológicamente idênticas mas diferir na produção da toxina (Baker *et al.* 2002). O uso de métodos moleculares permitiu o desenvolvimento de métodos de identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas. Contudo, o facto de geneticamente serem capazes de produzir a toxina (toxigénicas) não significa que a toxina esteja a ser produzida. Para confirmar que uma espécie de cianobactéria é realmente tóxica é essencial que se isole a espécie em cultura pura, podendo posteriormente detectar-se e quantificar-se as concentrações de toxina (WHO 1999).

Estirpes de cianobactérias produtoras de microcistinas possuem um cluster de genes de microcistina sintetase (*mcy*), essencial para a produção da toxina (Rinta-Kanto *et al.* 2009). Estirpes não produtoras, geralmente não possuem o cluster ou então contêm uma cópia incompleta deste, não conseguindo produzir a toxina (Rinta-Kanto *et al.* 2009). Com o aumento do uso de técnicas de biologia molecular, a amplificação de fragmentos de genes por PCR tem provado ser um método simples e sensível para diferenciar entre estirpes potencialmente produtoras ou não de microcistinas. Esta técnica tem várias vantagens quando comparada com os métodos tradicionais de monitorização da qualidade da água para cianobactérias, incluindo a rapidez, simplicidade e o baixo limite de detecção (Ouellette e Wilhelm 2003).

A análise foi feita para 22 estirpes, para detecção por PCR dos genes *16S rRNA* (fragmento específico de todas as cianobactérias), *16S rRNA* (fragmento específico de *Microcystis sp.*), *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* e para o fragmento HEP, o qual amplifica tanto uma região do gene *mcyE*, envolvido na síntese de microcistina, como uma região do gene *ndaF*, envolvido na síntese de nodularina. Destas estirpes, as identificadas como *Limnothrix sp.* e *M. wesenbergii* não possuíram qualquer gene envolvido na produção de microcistina e/ou nodularina. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Via-Ordurika e colaboradores (2004), em 13 cursos de água de 9 países Europeus, onde não foi detectada a amplificação de nenhum gene *mcy* para estirpes de *M. wesenbergii*.

No presente trabalho foram identificadas estirpes de *Microcystis aeruginosa* com os 4 genes envolvidos na produção das toxinas pesquisados (estirpes 9 e 16), outras só com alguns (estirpes 5, 15, 18 e 19) e outras sem nenhum (estirpes 6, 7, 8 e 17). A quantificação de microcistina por ELISA foi apenas realizada para as estirpes de *M. aeruginosa* 6, 7, 9, 15, 16, 19. Foi ainda realizada para a estirpe 1, *Aphanizomenon flos-aquae*, que tinha apresentado resultados positivos para o gene *mcyE* por PCR.

Estirpes de *M. aeruginosa* isoladas no mesmo local e na mesma data, como é o caso, por exemplo, das estirpes 8 e 9, apresentaram grande variação genética, ocorrendo na mesma florescência estirpes potencialmente produtoras e não produtoras de microcistina.

Num estudo realizado por Moreno e colaboradores (2004) no rio Guadiana foram igualmente observadas estas variações entre estirpes da mesma florescência. Otsuka e colaboradores (2001) concluíram que nas diferentes morfoespécies de *Microcystis* podem surgir estirpes produtoras e não produtoras de microcistinas. Estes resultados suportam a hipótese de que as florescências naturais de *M. aeruginosa* são compostas por estirpes quimicamente e geneticamente diversas, e que o crescimento de diferentes quimio-tipos pode contribuir para uma grande variação do conteúdo tóxico.

No presente trabalho foram isoladas poucas estirpes de *M. aeruginosa* por data e local, não sendo suficientes para inferir sobre a percentagem de estirpes produtoras de microcistinas, versus estirpes não produtoras. Vários estudos até hoje realizados apontam para que mais de 50% das estirpes de *M. aeruginosa* presentes em amostras naturais serem produtoras de microcistinas (Vasconcelos *et al.* 1995; Vasconcelos *et al.* 1996; Via-Ordorika *et al.* 2004; Saker *et al.* 2005a; Martins *et al.* 2009).

Apenas estirpes de *M. aeruginosa* positivos para os genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* e para o fragmento HEP (estirpes 9 e 16) foram positivos para microcistina no ensaio imunológico, com valores de toxina acima dos previstos pela legislação (1 µg MC-LR equivalentes/L). Os resultados observados encontram-se de acordo com a bibliografia, em que apenas estirpes que possuem o cluster de *mcy* completo é que produzem microcistina (Martins *et al.* 2009). A estirpe de *A. flos-aquae* também apresentou valores de 0,28 µg MC-LR equivalentes/L por ELISA.

Só as estirpes que por ELISA apresentaram a presença da toxina é que foram enviados para MALDI-TOF MS para determinação dos péptidos e variantes de microcistinas presentes nas amostras. Para as estirpes de *M. aeruginosa* houve uma relação entre os resultados obtidos nos vários ensaios, em que só as estirpes com os 4 genes envolvidos na produção da toxina foram positivos no ensaio imunológico de ELISA, confirmando-se posteriormente por MALDI-TOF MS a presença de microcistina nessas duas estirpes. A microcistina-LR foi a única variante de microcistina determinada na estirpe 16. Martins e colaboradores (2009), em amostras do Marco detectaram uma grande variedade de variantes de microcistinas, sendo as mais comuns MC-LR, -FR, -WR e -YR. Numa dessas amostras, tal como no presente trabalho, apenas uma variante de microcistina foi detectado (Martins *et al.* 2009). Em *M. aeruginosa* isoladas de cursos de água do norte e centro de Portugal, foram detectadas as variantes MC-LR (a mais comum), -LA, -RR e -YR (Vasconcelos 1995). Em muito menores quantidades, Vasconcelos (1995) também identificou a presença de MC-AR e [D-Asp³]MC-LR. Via-Ordorika e colaboradores (2004), em 13 cursos de água de 9 países europeus determinaram que as variantes de microcistina mais comuns em estirpes de *Microcystis*

eram MC-LR, -RR e -YR. Saker e colaboradores (2005a), além destas três variantes, também detectou na albufeira do Torrão a variante MC-WR.

Welker e colaboradores (2006) investigaram a diversidade de péptidos em colónias individuais de *Microcystis* por MALDI-TOF MS e demonstraram a presença de microcistinas, aeruginosinas, microgininas, anabaenopeptinas e cianopeptolinas.

Trabalhos realizados por Fastner e colaboradores (2001), Saker e colaboradores (2005a) e Martins e colaboradores (2009), verificaram que determinados péptidos, como aeruginosinas estão ausentes quando microcistinas são produzidas. No presente trabalho verificou-se, para a estirpe de *Microcystis aeruginosa* nº 16 a produção simultânea de aeruginosinas e MC-LR. Na estirpe 9 não foi possível, por MALDI-TOF MS determinar com certeza se estava a ocorrer a produção de microcistina ou de cianopeptolina. A confirmação só seria possível por fragmentação PSD (post-source decay). Para esta mesma estirpe também foi identificada a presença de microviridina. Os resultados de ELISA apontam para a presença de microcistina mas, Welker e colaboradores (2004) reportaram que a produção de microviridina ocorre simultaneamente com a produção de cianopeptolina.

Para a estirpe de *A. flos-aquae* tinha sido detectada a toxina por ELISA mas, por MALDI-TOF MS não se detectou qualquer variante de microcistina. Uma vez que as estirpes isoladas produzem uma grande variedade de outros metabolitos secundários, outros componentes, para além das microcistinas, podem ter contribuído para os resultados positivos obtidos por ELISA. Reacções cruzadas em ensaios de ELISA têm sido reportados, já existindo kits de ELISA com anticorpos de regiões mais conservadas da toxina, como para o aminoácido ADDA (Metcalf e Codd 2003).

Martins e colaboradores (2009) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho. De 47 estirpes isoladas, 28 (60%) foram positivas para os genes *mcyA* e *mcyB*, por análise de PCR, indicando a presença de genes envolvidos na produção de microcistinas (Martins *et al.* 2009). Estes resultados estavam de acordo com os obtidos por ELISA e MALDI-TOF MS, uma vez que as amostras com os genes *mcyA* e *mcyB* mostraram ter quantidades detectáveis de microcistinas por ensaio imunológico e pelo menos uma variante de microcistina por análise MALDI-TOF MS (Martins *et al.* 2009). As únicas excepções foram em duas amostras do Marco, que apesar da presença de genes envolvidos na biossíntese da toxina e da confirmação da presença da toxina por ELISA, não apresentaram microcistina por análise MALDI-TOF MS (Martins *et al.* 2009). Por outro lado, nenhuma amostra negativa para os genes *mcyA* e *mcyB* por PCR apresentou a produção da toxina (Martins *et al.* 2009).

Este estudo demonstra que as técnicas moleculares são úteis para a pesquisa em laboratório de genes codificantes das microcistinas, tendo estes resultados uma boa

correlação com os obtidos por MALDI-TOF MS, que se trata de uma técnica muito mais dispendiosa.

4. Conclusão

Na albufeira do Torrão verificou-se a ocorrência de cianobactérias, assim como a produção de microcistinas. A concentração, tanto de cianobactérias como de microcistinas, foi sempre superior no Marco, quando comparada com o Torrão, apontando para um efeito de dissolução ao longo do rio Tâmega. A espécie *M. aeruginosa* foi dominante durante as duas primeiras datas de amostragem, começando a sua ocorrência a diminuir no final do Verão, e aumentando a ocorrência de *A. flos-aquae*, espécie dominante na última data de amostragem. Contudo, a espécie *M. aeruginosa* parece ser a com maior importância a nível desta albufeira, devido tanto à sua dominância, como por aparentar ser a principal produtora de microcistinas.

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, apesar de já ter sido identificada como uma invasora em climas temperados, inclusive no centro e sul de Portugal, não foi encontrada na Albufeira do Torrão. A cilindrospermopsina, que também pode ser produzida pela espécie *Aphanizomenon flos-aquae*, a qual foi identificada na albufeira do Torrão, não foi detectada neste local.

Tendo em conta que as cianotoxinas representam um sério problema em águas usadas para consumo humano ou para fins recreativos, como é o caso da Albufeira do Torrão, maiores conhecimentos sobre a ocorrência desta espécie e suas toxinas são importantes. Além do mais, o local de amostragem do Marco encontra-se próximo de um ponto de captação de água para abastecimento público e, os tratamentos usualmente utilizados nas Estações de Tratamento de Água (ETA) não são eficazes na remoção de cianotoxinas, pelo que existe o risco delas estarem presentes na água destinada a consumo humano.

A identificação das cianobactérias, realizada por microscopia óptica, numa primeira fase, mostrou ser essencial, pois permitiu determinar qual a melhor abordagem a seguir.

Devido à enorme variação e complexidade da distribuição das cianobactérias, a detecção por PCR de clusters de genes demonstrou ser uma forma fácil para identificar a possível presença de compostos secundários como as microcistinas. Estas técnicas foram facilmente empregues tanto em culturas, como em amostras ambientais.

Este trabalho demonstrou a importância dos métodos moleculares na implementação de uma monitorização de rotina. Em cursos de água dominados por *M. aeruginosa*, será de interesse a implementação de um método que procure pelo menos dois genes do cluster, pertencentes a operações diferentes, como é o caso do *mcyA* e do *mcyE*. A presença dos genes *mcy*, no presente estudo, pode ser correlacionada com a formação de microcistinas. Só espécies com todos os genes do cluster de microcistina pesquisados

é que foram tóxicas. Por outro lado, foi possível verificar que a presença destes genes não se reflecte necessariamente na produção das toxinas.

Por PCR em tempo real, verificou-se, em algumas datas, que a presença de genes envolvidos na produção da toxina poderiam corresponder à existência de outras espécies potencialmente produtoras, que não *M. aeruginosa*. Assim, em trabalhos posteriores seria interessante a focagem na pesquisa de outras espécies e determinação das suas toxinas nesta albufeira.

A técnica de RT-qPCR, no presente trabalho, mostrou ser mais sensível para detecção de genes que a técnica de PCR convencional, tendo sido ainda capaz de quantificar o número de genes. Esta quantificação, de futuro, poderá ser essencial em monitorizações de rotina, devido à rapidez com que se obtêm os resultados, evitando assim a quantificação de cianobactérias por microscopia. Os genes escolhidos na amplificação de PCR em tempo real, nomeadamente os para identificação de cianobactérias e do género *Microcystis*, não foram os mais adequados, pois podem surgir várias cópias destes genes por genoma, resultando em quantificações que não correspondem às reais. Assim, deverá ser tido em consideração a escolha de regiões do genoma mais conservadas, onde só surja uma cópia de cada gene. Igualmente, deve ser feita uma optimização da reacção para que os resultados obtidos possam ser os mais próximos da realidade.

No presente trabalho verificou-se, que numa amostra natural ocorrem, dentro da mesma espécie, estirpes potencialmente produtoras de microcistinas e outras não produtoras. Assim, as populações naturais de *Microcystis* são constituídas por organismos geneticamente diferentes, cada qual com diferentes tolerâncias a factores ambientais e diferentes potenciais tóxicos. Esta variedade pode explicar as oscilações de microcistinas em ambientes naturais. Das estirpes isoladas, correspondendo às espécies de *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *A. flos-aquae* e *Limnothrix sp.*, só as estirpes de *M. aeruginosa* é que apresentaram ser toxigénicas e produtoras da toxina.

O conhecimento dos factores ambientais que afectam a produção da toxina é indispensável para a compreensão da ecologia de cianobactérias tóxicas, sendo que a monitorização da expressão génica da toxina e a abundância desta, em resposta a uma variedade de factores físicos, químicos e bióticos é essencial.

Para a quantificação de microcistinas, os métodos imunológicos de ELISA mostraram ser mais adequados que os de cromatografia (HPLC), uma vez que o limite de detecção por este método é inferior ao imposto pela legislação em vigor. A quantificação por ELISA, para monitorização da qualidade das águas deve sempre contemplar a análise de microcistinas totais, ou seja, tanto endo como exotoxinas. O facto de por HPLC não ter sido detectada a presença da toxina, não significa que este método não se adequa e uma

monitorização de rotina. Este método tem grandes vantagens, quando comparado com a técnica de ELISA, pois permite distinguir entre variantes de microcistina.

As técnicas moleculares, quando usadas em combinação com outras, como a de ELISA, demonstraram ser bastante úteis, devido à rapidez, sensibilidade e a capacidade de se poder adequar a uma monitorização de rotina.

Por MALDI-TOF MS foi possível verificar que nas amostras naturais e nas estirpes isoladas surgem diferentes tipos de compostos produzidos por cianobactérias, para além das microcistinas. A variante microcistina-LR foi a única microcistina identificada. Para a obtenção de melhores resultados, em trabalhos futuros, um maior volume de amostra deve ser preparado para a análise de espectrometria. Uma vez que inúmeros factores podem interferir com a degradação de cianotoxinas, as amostras devem ser o mais brevemente preparadas para este tipo de análise.

Normalmente, os volumes de amostragem são relativamente elevados, podendo dificultar o transporte e o seu rápido processamento em laboratório. Neste trabalho, verificou-se, que de uma maneira geral, volumes tão pequenos como de 50 mL parecem ser suficientes para a obtenção de bons resultados. Contudo, este volume de amostragem não pode ser generalizado. Para cada local de amostragem, a quantidade de cianobactérias presentes no local, assim como a quantidade de sedimentos e de inibidores naturais vão interferir na escolha deste volume. Quanto maior a quantidade de cianobactérias, de sedimentos e de inibidores naturais, menor deverá ser o volume amostrado. Em trabalhos futuros, será de interesse fazer uma correlação entre volumes de amostragem, turbidez das águas, e quantidades de DNA presentes nas amostras.

Através do uso de técnicas de microscopia, moleculares, de HPLC e de ELISA, foi possível, no presente trabalho, demonstrar a presença de cianobactérias tóxicas na albufeira do Torrão. Esta ocorrência não se restringiu apenas aos meses mais quentes, sendo que as maiores concentrações de toxina foram determinados no início do mês de Outubro. A aplicação de todos estes métodos permitiu detectar, diferenciar, quantificar e monitorizar cianobactérias tóxicas e cianotoxinas. Diferentes métodos providenciam diferentes informações, por vezes complementares, sendo que este tipo de análise multidisciplinar é necessária porque nenhum método é suficientemente completo para se poder obter toda a informação necessária.

Através dos resultados verificou-se que uma análise multidisciplinar parece ser a mais acertada para inferir sobre a ocorrência das florescências e produção da toxina: (1) por exame microscópico obtém-se informação sobre a densidade, diversidade e composição das espécies, sugerindo a existência de espécies tóxicas; (2) por PCR é possível a pesquisa nas amostras ambientais de genes envolvidos na produção da toxina e das principais espécies produtoras, inferindo sobre a possível produção de toxina; (3) por

ELISA é possível a quantificação da toxina, uma vez que é um método sensível, específico e fácil de realizar; (4) nos casos em que a produção da toxina for confirmada, o isolamento e cultura das possíveis estirpes tóxicas, é essencial para compreensão das dinâmicas de produção de toxina; (5) por último, para as amostras positivas para a toxina, por ELISA, para análise qualitativa e quantitativa devem ser empregues métodos como o de HPLC e o de MALDI-TOF MS.

A elevada e rápida variação da densidade de fitoplâncton tornam difícil de definir estratégias de amostragem. Variações tóxicas observadas tanto inter como intra estirpes de cianobactérias amostradas, reflectem a natureza imprevisível das florescências, no que respeita a produção da toxina e a ocorrência. A detecção precoce de estirpes de cianobactérias tóxicas em amostras de água é indispensável para a prevenção de problemas de saúde pública, uma vez que permite a aplicação de medidas correctivas antecipadamente. O uso de técnicas moleculares em combinação com a quantificação da toxina providencia uma informação completa para protecção da população de riscos para a saúde.

5. Bibliografia

- Adams DG, Duggan PS. 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* 144(1):3-33.
- Akcaalan R, Young FM, Metcalf JS, Morrison LF, Albay M, Codd GA. 2006. Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix spp.* in laboratory cultures and environmental blooms. *Water Research* 40(8):1583-1590.
- Albertano P, Gallon JR, Caiola MG, Hoffman L. 2006. Cyanobacteria: morphology, taxonomy, ecology. Proceedings of the 13th Symposium of the International Association for Cyanobacteria Research (IAC). Frascati (Italy), 1995. Stuttgart, Germany: E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung.
- An JS, Carmichael WW. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32(12):1495-1507.
- Anjos FM, Bittencourt-Oliveira MC, Zajac MP, Hiller S, Christian B, Erler K, Luckas B, Pinto E. 2006. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* 48(3):239-245.
- Apeldoorn ME, Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJ. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(1):7-60.
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil. *Toxicology* 181-182:441-446.
- Baker JA, Neilan BA, Entsch B, McKay DB. 2001. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. *Environmental Toxicology* 16(6):472-482.
- Baker JA, Entsch B, Neilan BA, McKay DB. 2002. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12):6070-6076.
- Baker P. 1991. Identification of common noxious cyanobacteria. Part I - Nostocales. Australia: Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research.
- Bittencourt-Oliveira MC. 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae* 2(1):51-60.
- Bláhová L, Oravec M, Marsálek B, Sejnohová L, Simek Z, Bláha L. 2009. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon* 53(5):519-524.
- Boaru DA, Dragos N, Welker M, Bauer A, Nicoara A, Schirmer K. 2006. Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters. *Toxicon* 47(8):925-932.
- Bobbin J, Recknagel F. 2001. Knowledge discovery for prediction and explanation of blue-green algal dynamics in lakes by evolutionary algorithms. *Ecological Modelling* 146(1-3):253-262.
- Carmichael WW. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 72(6):445-459.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. 2005. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3):264-272.
- Cronberg G, Annadotter H. 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. Denmark: International Society for the Study of Harmful Algae, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.
- Dawson RM. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36(7):953-962.
- Dietrich DR, Hoeger S. 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3):273-289.

- Dittmann E, Börner T. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3):192-200.
- Dittmann E, Wiegand C. 2006. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research* 50(1):7-17.
- Dokulil MT, Teubner K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438:1-12.
- Entwistle TJ, Sonneman JA. 1997. *Freshwater algae in Australia*. Australia: Saintry & Associates.
- Falconer IR, Humpage AR. 2001. Preliminary evidence for *in vivo* tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 16(2):192-195.
- Falconer IR, Humpage AR. 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* 21(4):299-304.
- Fastner J, Erhard M, von Dohren H. 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis spp.* (Cyanobacteria) by typing single colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11):5069-5076.
- Fergusson KM, Saint CP. 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18(2):120-125.
- Fessard V, Bernard C. 2003. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environmental Toxicology* 18(5):353-359.
- Foulds IV, Granacki A, Xiao C, Krull UJ, Castle A, Horgen PA. 2002. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR. *Journal of Applied Microbiology* 93(5):825-834.
- Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology* 18(4):243-251.
- Funari E, Testai E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 38(2):97 - 125.
- Furukawa K, Noda N, Tsuneda S, Saito T, Itayama T, Inamori Y. 2006. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase a gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(2):90-96.
- Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé C, Borbély G, Saker ML, Gyori J, Farkas A, Vehovszky Á, Bánfalvi G. 2009a. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in vitro* 23(4):710-718.
- Gkelis S, Rajaniemi P, Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Lanaras T, Sivonen K. 2005. *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. *Microbial Ecology* 49:176-182.
- Gobler CJ, Davis TW, Coyne KJ, Boyer GL. 2007. Interactive influences of nutrient loading, zooplankton grazing, and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. *Harmful Algae* 6(1):119-133.
- Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180(6):402-410.
- Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. 2008. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7(5):671-681.
- Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472(1-2):155-161.
- Humpage AR, Falconer IR. 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology* 18(2):94-103.

- Ibelings BW, Chorus I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150(1):177-192.
- Iteman I, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Herdman M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146(6):1275-1286.
- Izaguirre G, Jungblut A-D, Neilan BA. 2007. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Research* 41(2):492-498.
- Jaehniche S, Petzoldt T, Benndorf J. 2001. Evidence for control of microcystin dynamics in Bautzen Reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon. *Archiv fuer Hydrobiologie* 150(2):177-196.
- Jungblut A-D, Hawes I, Mountfort D, Hitzfeld B, Dietrich DR, Burns BP, Neilan BA. 2005. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology* 7(4):519-529.
- Jungblut A-D, Neilan BA. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 185(2):107-114.
- Kinnear SHW, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD. 2007. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. *Harmful Algae* 6(5):642-650.
- Kokocinski M, Dziga D, Spoo L, Stefaniak K, Jurczak T, Mankiewicz-Boczek J, Meriluoto J. 2009. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. *Chemosphere* 74(5):669-675.
- Komarek J, Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokariota 1. *Chroococcales*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 548pp. p.
- Komarek J, Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokariota 2. Oscillatoriales. Munchen: Elsevier GmbH. 749 pp. p.
- Kondo R, Yoshida T, Yuki Y, Hiroishi S. 2000. DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2):767-770.
- Kurmayer R, Kutzenberger T. 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11):6723-6730.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology* 6(8):831-841.
- Mankiewicz J, Tarczynska M, Walter Z, Zalewski M. 2003. Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia* 45(2):9-20.
- Martins E. 2007. Ecologia e toxicologia em cianobactérias em sistemas dulceaquícolas artificiais (Albufeira do Torrão e estação de tratamento de águas residuais em Esmoriz). Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia. Porto: Universidade do Porto.
- Martins J, Saker ML, Moreira C, Welker M, Fastner J, Vasconcelos VM. 2009. Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:951-961.
- Martins R, Pereira P, Welker M, Fastner J, Vasconcelos VM. 2005. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 46(4):454-464.
- Masango M, Myburgh J, Botha C, Labuschagne L, Naicker D. 2008. A comparison of *in vivo* and *in vitro* assays to assess the toxicity of algal blooms. *Water Research* 42(13):3241-3248.
- Mathys W, Surholt B. 2004. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207(6):601-605.
- McElhiney J, Lawton LA. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3):219-230.

- Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Törökné AK, Codd GA. 2002. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40(8):1115-1120.
- Metcalf JS, Codd GA. 2003. Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods. *Chemical Research in Toxicology* 16(2):103-112.
- Mitsuhiro Yoshida, Takashi Yoshida, Yukari Takashima, Naohiko Hosoda, Shingo Hiroishi. 2007. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters* 266(1):49-53.
- Moreno I, Cameán A, Tavares MJ, Pereira P, Franca S. 2003. Toxicity of cyanobacteria isolated from the Guadiana river. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 6(4):409-413.
- Moreno I, Pereira P, Franca S, Cameán A. 2004. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana river (southwestern Spain). *Biological Research* 37:405-417.
- Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology* 78(4):382-397.
- Neilan BA, Jacobs D, Therese DD, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(3):693-697.
- Neilan BA. 2002. The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Current Issues in Molecular Biology* 4:1-11.
- NHMRC, 2008. Guidelines for managing risks in recreational water. National Health and Medical Research Council, Australian Government.
- Nogueira ICG, Saker ML, Pflugmacher S, Wiegand C, Vasconcelos VM. 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 19(5):453-459.
- Nonneman D, Zimba PV. 2002. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology* 38(1):230-233.
- Norris RLG, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 40(4):471-476.
- Nubel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3327-3332.
- OECD. 2005. Emerging risks to water supplies: Best practice for improved management and preparedness to protect public health.
- Oliva-Teles L, Vasconcelos VM, Pereira E, Saker ML. 2006. Time series forecasting of cyanobacteria blooms in the Crestuma reservoir (Douro River, Portugal) using artificial neural networks. *Environmental Management* 38(2):227-237.
- Oliva-Teles L, Pereira E, Saker ML, Vasconcelos VM. 2008. Virtual experimentation on cyanobacterial bloom dynamics and its application to a temperate reservoir (Torrão, Portugal). *Lakes & Reservoirs: Research & Management* 13(2):135-143.
- Otsuka S, Suda S, Li R, Watanabe M, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe MM. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters* 164(1):119-124.
- Otsuka S, Suda S, Li R, Matsumoto S, Watanabe MM. 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *The Journal of General and Applied Microbiology* 46(1):39-50.
- Otsuka S, Suda S, Shibata S, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3):873-879.
- Ouahid Y, Pérez-Silva G, del Campo F. 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology* 20(3):235-242.

- Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos VM, Namikoshi N. 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicon* 39(9):1375-1381.
- Ouellette AJA, Wilhelm SW. 2003. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1(7):359-366.
- Ouellette AJA, Handy SM, Wilhelm SW. 2006. Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities *Microbial Ecology* 51(2):154-165.
- Pearson LA, Neilan BA. 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 19(3):281-288.
- Pereira EGM. 1998. Eutrofização do rio Tâmega (troço Amarante-Entre-os-Rios). Ocorrência de cianobactérias tóxicas. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 100pp p.
- Pflugmacher S, Jung K, Lundvall L, Neumann S, Peuthert A. 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extraction on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(9):2381-2387.
- Prakash S, Lawton LA, Edwards C. 2009. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae* 8(3):377-384.
- 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.
- Quesada A, Sanchis D, Carrasco D. 2004. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* 23(1-2):109-118.
- Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepisto L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, Sivonen K. 2006. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (mcyE) PCR and associations with environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9):6101-6110.
- Rapala J, Erkoma K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K. 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 466(2):213-231.
- Rasmussen JP, Barbez PH, Burgoyne LA, Saint CP. 2008a. Rapid preparation of cyanobacterial DNA for real-time PCR analysis. *Letters in Applied Microbiology* 48:14-19.
- Rasmussen JP, Giglio S, Monis PT, Campbell RJ, Saint CP. 2008b. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104(5):1503-1515.
- Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridheman TB, Wilhelm SW. 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science & Technology* 39:4198-4205.
- Rinta-Kanto JM, Saxton MA, DeBruyn JM, Smith JL, Marvin CH, Krieger KA, Sayler GS, Boyer GL, Wilhelm SW. 2009. The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie. *Harmful Algae* 8(3):385-394.
- Rivasseau C, Racaud P, Deguin A, Hennion M-C. 1999. Evaluation of an ELISA kit for the monitoring of microcystins (cyanobacterial toxins) in water and algae environmental samples. *Environmental Science & Technology* 33(9):1520-1527.
- Rücker J, Stüken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon* 50(6):800-809.

- Saker ML, Eaglesham GK. 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 37(7):1065-1077.
- Saker ML, Thomas AD, Norton JH. 1999. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. *Environmental Toxicology* 14(1):179-182.
- Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55(2):243-250.
- Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM. 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 43(2):185-194.
- Saker ML, Fastner J, Dittmann E, Christiansen G, Vasconcelos VM. 2005a. Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *Journal of Applied Microbiology* 99(4):749-757.
- Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. 2005b. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 46(5):555-562.
- Saker ML, Vale M, Kramer D, Vasconcelos VM. 2007a. Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(2):441-449.
- Saker ML, Welker M, Vasconcelos VM. 2007b. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(5):1136-1142.
- Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T. 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research* 40(19):3485-3496.
- Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16(5):413-421.
- Shen X, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40(10):1499-1501.
- Singh S, Kate BN, Banerjee UC. 2005. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*: Taylor & Francis Ltd. p 73-95.
- Smith JL, Boyer GL, Zimba PV. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280(1-4):5-20.
- Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokolke L, Sivonen K. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7289-7297.
- Vale SM. 2005. Comunidades planctónicas na albufeira do Torrão. Eutrofização e biodiversidade. Porto: Universidade do Porto.
- Valério E, Pereira P, Saker ML, Franca S, Tenreiro R. 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* 4(6):1044-1052.
- Vasconcelos VM. 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in portuguese fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie* 130(4):439-451.
- Vasconcelos VM. 1995. Toxicologia de cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 137pp p.

- Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend Elekin. *Archiv für Hydrobiologie* 134(3):295-305.
- Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. *Water Research* 30(10):2377-2384.
- Vasconcelos VM. 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:249-254.
- Vasconcelos VM. 2001. Cyanobacteria toxins: Diversity and ecological effects. *Limnetica* 20(1):45-58.
- Vasconcelos VM. 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica* 25(1-2):425-432.
- Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, Hisbergues M, Dittmann E, Komarek J, Erhard M, Chorus I. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis sp.* in european freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology* 27(5):592-602.
- Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, von Dohren H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. *Microbiology* 150(6):1785-1796.
- Welker M, Marsálek B, Sejnohová L, von Döhren H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides* 27(9):2090-2103.
- White SH, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD, Eaglesham GK. 2007. Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. *Environmental Pollution* 147(1):158-167.
- WHO. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. In: Chorus I, Bartram J, editors. London and New York: World Health Organization.
- WHO. 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Organization WH, editor. Guidelines for safe recreational water environments. Vol.1 - Coastal and fresh waters. Geneva, Switzerland. p 136-158.
- Wilson KM, Schembri MA, Baker PD, Saint CP. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1):332-338.
- Xu Y, Wu Z, Yu B, Peng X, Yu G, Wei Z, Wang G, Li R. 2008. Non-microcystin producing *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environmental Pollution* 156(1):162-167.
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi H. 2007. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters* 266(1):49-53.
- Young FM, Micklem J, Humpage AR. 2008. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reproductive Toxicology* 25(3):374-380.

Anexo I

As imagens presentes neste anexo referem-se aos resultados da amplificação dos genes por PCR.

As figuras 1 a 6 correspondem aos resultados de PCR para as amostras ambientais. As figuras 7 a 13 aos resultados das amostras ambientais para otimização dos volumes e as figuras 14 a 19 às estirpes isoladas. O marcador 100bp EZ Load Molecular Ruler (BioRad) foi o utilizado para a figura 2. O marcador utilizado para as figuras figuras foi marcador 1Kb plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb).

Amostras ambientais

Legenda:

1	Marco 19-9	4	Marco 29-10	7	Torrão 15-10	+	Controlo Positivo M6
2	Marco 1-10	5	Torrão 19-9	8	Torrão 29-10	B	Branco
3	Marco 15-10	6	Torrão 1-10				

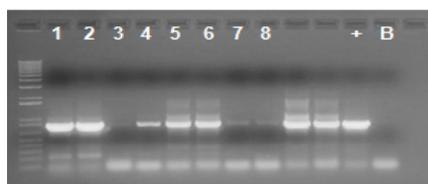


Figura 1 – Produto da amplificação do gene 16S *rRNA*.

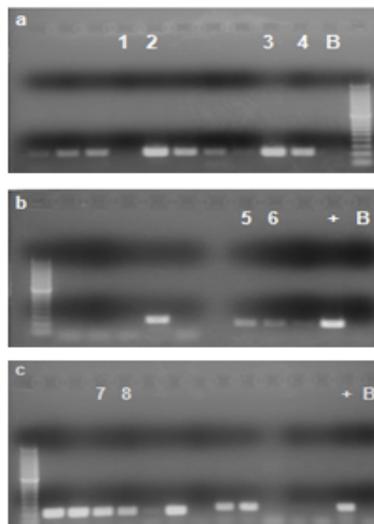


Figura 2 (a,b,c)– Produto da amplificação do gene 16S *rRNA* específico de *Microcystis*.



Figura 3 – Produto da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase (*mcyA*).



Figura 4 – Produto da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase B (*mcyB*).

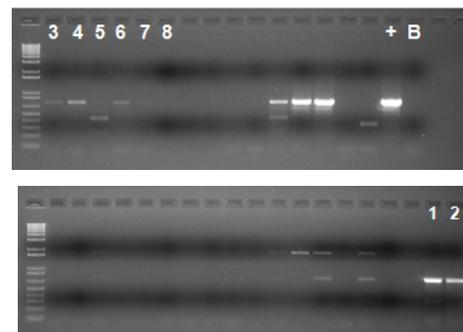


Figura 5 – Produto da amplificação do gene codificante da microcistina poliquetídio sintase (*mcyE*).

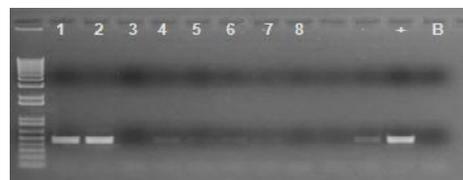


Figura 6 – Produto da amplificação do gene codificante da microcistina/nodularina sintetase (*mcyE/ndaF*) (fragmento HEP).

Amostras ambientais para otimização do volume

Legenda:

1	Marco 15 ml 19/9	5	Marco 250 ml 1/10	9	Torrão 250 ml 19/9	13	Torrão 500 ml 1/10
2	Marco 50 ml 19/9	6	Marco 500 ml 1/10	10	Torrão 500 ml 19/9	14	Torrão 1000 ml 1/10
3	Marco 250 ml 19/9	7	Marco 1000 ml 1/10	11	Torrão 1000 ml 19/9	+	Controlo positivo
4	Marco 500 ml 19/9	8	Torrão 50 ml 19/9	12	Torrão 250 ml 1/10	B	Branco

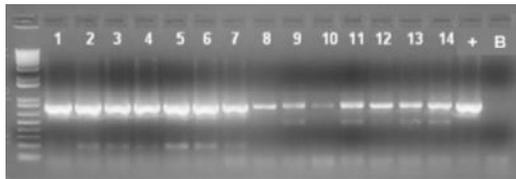


Figura 7 - Produto da amplificação do gene *16S rRNA*.

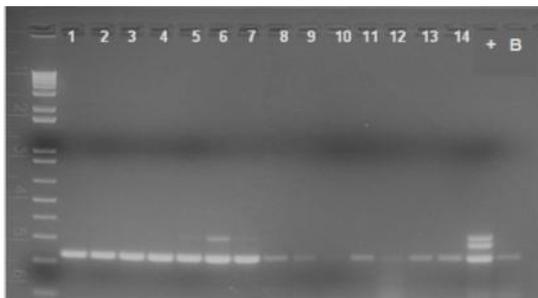


Figura 8 – Produto da amplificação por multiplex PCR para os genes *16S rRNA* específico de *Microcystis*, codificantes de microcistina sintetase (*mcyA*) e microcistina sintetase B (*mcyB*).

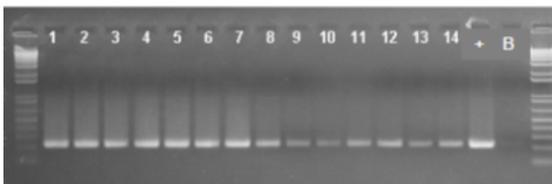


Figura 9 - Produto da amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*.

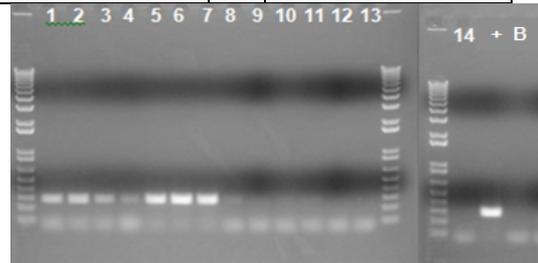


Figura 10 - Produto da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase (*mcyA*).

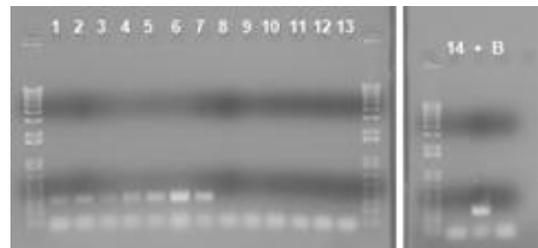


Figura 11 - Produto da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase B (*mcyB*).



Figura 12 - Produto da amplificação do gene codificante da microcistina poliquetídio sintase (*mcyE*).



Figura 13 - Produto da amplificação do gene codificante da microcistina/nodularina sintetase (fragmento HEP).

Estirpes isoladas

Legenda:

1	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	9	<i>M. aeruginosa</i>	16	<i>M. aeruginosa</i>
2	<i>Limnothrix sp.</i>	10	<i>M. wesenbergii</i>	17	<i>M.aeruginosa</i>
b3	<i>Limnothrix sp.</i>	11	<i>M. wesenbergii</i>	18	<i>M.aeruginosa</i>
4	<i>Limnothrix sp.</i>	12	<i>M. wesenbergii</i>	19	<i>M.aeruginosa</i>
5	<i>Microcystis aeruginosa</i>	13	<i>M. wesenbergii</i>	20	<i>M.wesenbergii</i>
6	<i>M. aeruginosa</i>	14	<i>Limnothrix sp.</i>	21	<i>M.wesenbergii</i>
7	<i>M. aeruginosa</i>	15	<i>M. aeruginosa</i>	22	<i>M.wesenbergii</i>
8	<i>M. aeruginosa</i>				

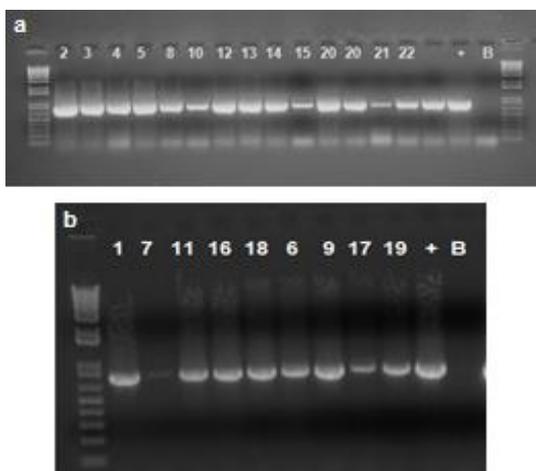


Figura 14 (a, b) - Produtos da amplificação do gene 16S rRNA.

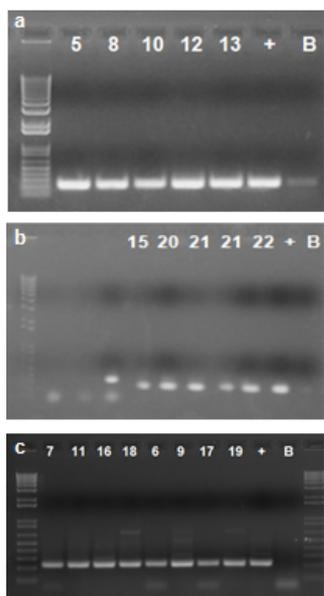


Figura 15 (a, b, c) - Produtos da amplificação do gene 16S rRNA específico de *Microcystis*.

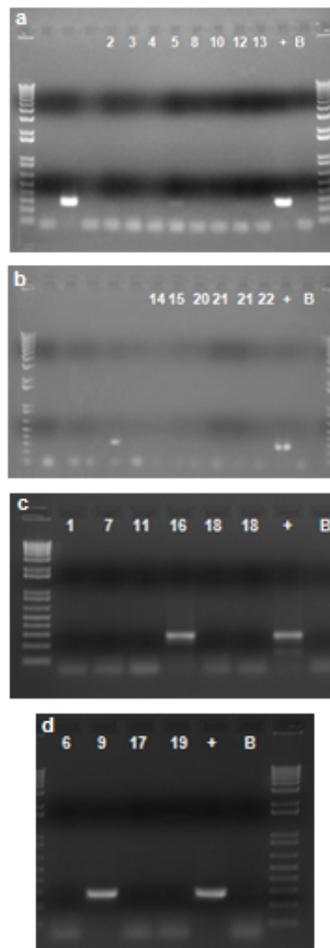


Figura 16 (a, b, c, d) - Produtos da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase (*mcyA*).

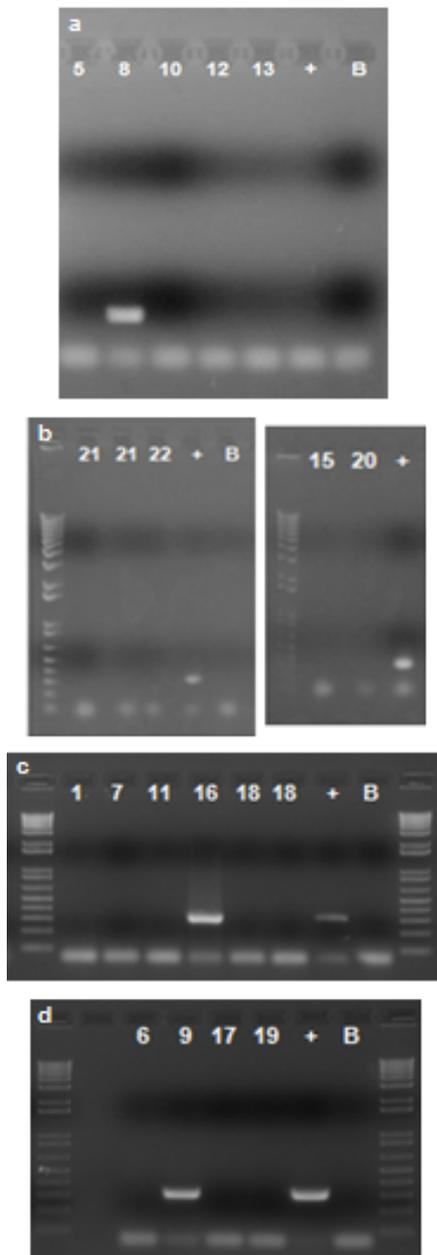


Figura 17 (a, b, c, d) - Produtos da amplificação do gene codificante da microcistina sintetase B (*mcyB*).

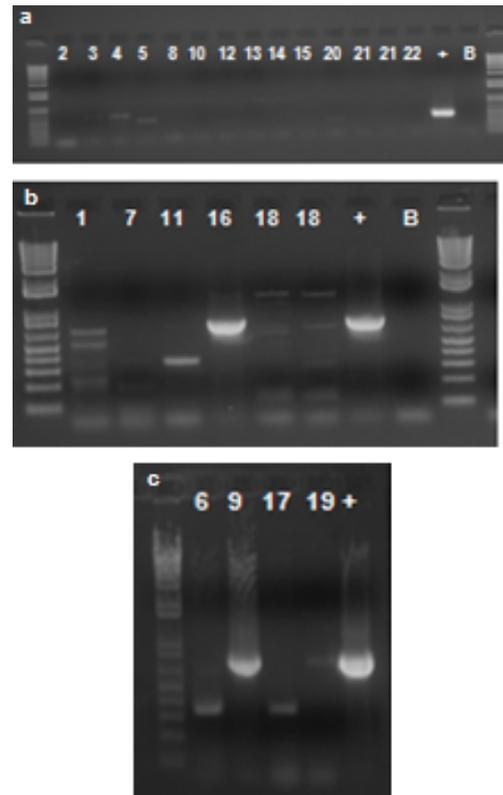


Figura 18 (a, b, c) - Produtos da amplificação do gene codificante da microcistina poliquetídio sintase (*mcyE*).

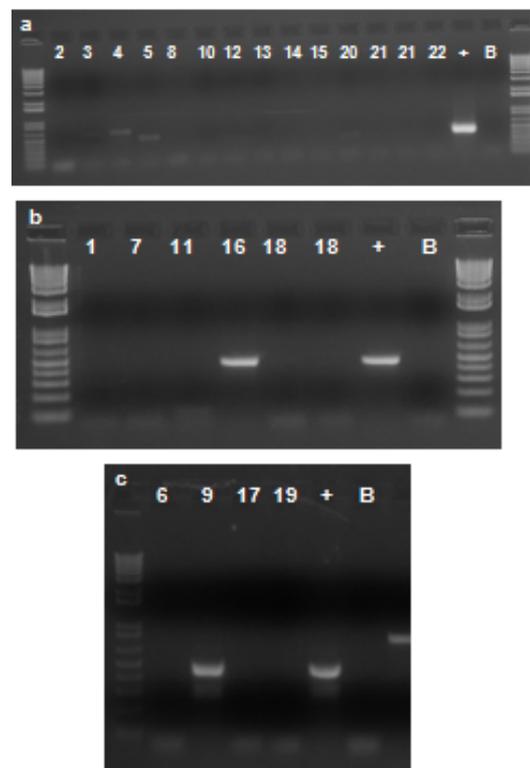


Figura 19 (a, b, c) - Produtos da amplificação do gene codificante da microcistina/nodularina sintetase (fragmento HEP).

Anexo II

As sequências que se seguem referem-se às sequências amplificadas, através do gene 16S rRNA, para determinação das espécies das estirpes em cultura. Todas as sequências encontram-se no sentido 5' 3'. Os caracteres a vermelho e negrito correspondem a nucleótidos introduzidos às sequências originais, por comparação da sequência inversa e complementar.

Estirpe 1 – *Aphanizomenon flos-aquae*

TTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTT**A**ACACATGCAAGTCGACGGTCTTTTAGGAGACAGTGGC
GGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTTCAGGTTGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGAATGTGC
CGAGAGGTGAAAGGCTTGCCTGACCTGAAGAAGAGCTTGCCTGCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGACTACCAAGGC
GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAA
ACCTCTTTCTCAGGGAAGAACAAGATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGTAAGTCTGCTGTTAAA
GAGTTTGGCTCAACCAATAAGAGCAGTGGAACTACAAAGCTAGAGTGTGGTCCGGGCAGAGGAATTCCTGGTGT
GCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGAGACTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTAT
CGACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
TGTCACGAATCCTGTGGAACATGGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAGGTTGGGCACTTAG
AGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACA
CGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCGTAAACCGTAGCTCAGTTCAGAT
CGAAGGCTGCAACTCGCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTATGGAGGGGGAT
GCCTAAGG

Estirpe 2 – *Limnothrix sp.*

TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTTCTTCGGAACCTAGTG
GCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACATTTGAAACGAATGCTAATACCCGATGT
GCCGCAAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGACCCCAAG
GCGACGATCGGTAGCTGGTTTGAAGGACAATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTGTGGGTTGT
AAACCTCTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAAGGCGGTTTCGTAAGTCTGTCTTTAA
AGAGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAACCTGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCAGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCAGCGAAGGCGTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTAT
CGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
TCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCCGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGACTCTAG
GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACA
CGTACTACAATGGTCCGGACAAAGGGCAGCGAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGAAAACCCGGCCCAAGTTCAGA
TTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCC
GGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTGCCGAAGTCATTACCCTAACCGCTTGCAGGGG
GGATGCCTAAGGCA

Estirpe 3 – *Limnothrix sp.*

GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGAT**T**CTTCGGAATCTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACATTTGAAACGAATGCTAATACCCGATGTGCCGCAA
GGTGAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGACTACCAAGGCGACGA
TCGGTAGCTGGTTTGAAGGACAATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTGTGGGTTGTAAACCTC
TTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACG

GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGAGTGG
 AGCTTAACCTCCATAAAGGGGATGGAACTGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATCCCAAGTGTAGCGGTG
 AAATCGCTAGATATGGGAAGAACCACGACGCAAGGCGTTCTACTGGACCAACCTGACGCTCANGGACGAAAGCT
 AGGGGAGCGAAAGGATTAGATACCCCTGTAGTCCCTAGCCGTAACCGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCG
 TGCAGTCCCGTAGCCAACCGGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATCCTACG
 AATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTCTAGGGGAGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACAGTACTAC
 AATGGTCGGGACAAAGGCGAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGAAAACCCGGCCCCAGTTCAGATTGCAGGC
 TGCAACTCGCTGCATGAAGGAGGAATCGTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTGCCGAAGTCATTACCCTAACCGCTTGGCGAGGGGGATGCCTA
 AGGCA

Estirpe 4 – *Limnothrix* sp.

TTACCACATGCAAGTGAACGGTGTCTTCGGACATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGAGAACCCTGCCTAC
 AGGCTGGGGACAACGACTGGAACCGTTCGCTAATACCCAATGAACCGAGAGGTAAGGATTAATCGCCTGAAGATGGG
 CTCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGATGATCGGTAGCTGTTTGGAGGACAATCAG
 CCACACTGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCT
 GACGGAGCAATACCGCGTGGGGGACGAAGGTCTGTGGATTGTAACCCCTTTTCTCTAGGAAGAACAATGACGGTA
 CTAGAGGAATCAGCATCGGCTAACCCTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
 GGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGTTAAACAAGTCTACCCTTAAAGAGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGGTGGAAAC
 TGTATAACTAGAGGTCCGTAGAGGTAAGAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACCACCA
 GCAGCGAAGGCGTCTTACTGGACCGAATCTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCC
 TGATGCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCAGTATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACCGGTTAAGT
 GTCCCGCTGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTTTTGACATCCTGCGAATCTTCTTGAAGGGGAAGAGTGCCTT
 GGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCACGCTCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTG
 GATGACGTCAAGTATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACAGTACTACAATGGTTGGGACAAAGGGCAGCGAGCC
 TGCGAAGGCAAGCTAATCTCGTAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCGAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATC
 GCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGT
 TGGTTTTGCCGAAGTCATTACCCTAACCTTCGAGGAGGGGGATGCCGAAGGCA

Estirpe 6 – *Microcystis aeruginosa*

TGGCGCGTGCCTAACATGCAAGTGAACGGGAATCTTCGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA
 GAATCTAATTCAGGACGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGG
 CCTGGAGAAGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGA
 GAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGACACCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTCCGCAAT
 GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAA
 GTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACCCTGCGCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTT
 ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAAACGACCTAA
 AGGCGGTGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
 TGGGAAGAATCGGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAG
 GGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAG
 CTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAA
 GCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGACTTGACATGTGCGGAACCCTGGTGAAA
 GCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 AAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCGAGGCTGCAACTCGCC
 TGCATGAAGGAGGAATCGTAGTAATCGCCGTCAGCATAACGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCATGGAAGTGGTACGCCCCGAAGTCATTACCTAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAG

Estirpe 7 – *Microcystis aeruginosa*

CGGTGCCTACACATGCAAGTGAACGGGAATCTTCGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAAGTCT
 TAATTCAGGACGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGG
 AGAAGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 TGAACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCG
 AAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTG
 ACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACCCTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGTCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAAACGACCTAAAGGCGG
 TGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAA

GAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGAATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTA
 GATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACG
 CGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTG
 GAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGGAACCCCTGGTAAAAGCTGGG
 GGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAAGGG
 CAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
 AAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCA

Estirpe 8 – *Microcystis aeruginosa*

CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGAATCTTAGGATTCTAGTGCGGACGG
 GTGAGTAACCGTAAGAATCTAACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAG
 GTGAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGGCAACGAT
 CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTC
 TTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACG
 GGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCGAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTAACATCAGG
 TTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGT
 GAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAATCGGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAG
 CTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGAC
 CCGAGCCGTGCCGAAGCTAACCGCTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTC
 GCGAACCCTGGTGAAGCTAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCG
 TGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAG
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACAGTA
 CTACAATGGTTCGGGACAAAAGGGCAGCGAAGTCCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTTCAATTG
 CAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGAT
 GCCTAAGCGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAC

Estirpe 9 – *Microcystis aeruginosa*

CGGTGCCTACACATGCAAGTCGAACGGGAATCTTCGATTCTAGTGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAAGAATCT
 AACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAA
 GAAGAGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
 GAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCG
 AAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTG
 ACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGACAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTAACATCAGGTTGCTTAAACGACCTAAAGGCGG
 TGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAA
 GAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTA
 GATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACG
 CGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTG
 GAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGGAACCCCTGGTAAAAGCTGGG
 GGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAAGGG
 CAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
 AAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCGAGGGCTAGTGACT
 GGGGTGAAGTCGTAACAAGGT

Estirpe 10 – *Microcystis wesenbergii*

GGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAGCTT
 GCGTTTGTAGTAGTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA
 CGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTT
 GAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGCGTCCGACAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTAACATCAGGTTGCTTAAACGACCTAAAGGCGGTGAAACTG
 GCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAATCGG
 TGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCT
 GTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTA

TCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTG
 GTTTAATTGCATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGCAACCCTGGTGAAGCTGGGGGTGCCTC
 GGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCCTCGTCTTAGTGGCAGCATTAAAGTTGGGGACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAAGTACAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACAGTACTACAATGGTCGGGACAAAGGCGAGCGAACT
 CGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAA
 TCGTAGTAATCGCCGTCAGCATAACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAA
 GCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATG

Estirpe 11 – *Microcystis wesenbergii*

GATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAACACATGCAAGTGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTG
 GCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAATTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGT
 GCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAGCTTGGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
 GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTG
 TAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTC
 AAATCAGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACAATCGGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGG
 GACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTGGGCGTGGCTT
 GCATCTACCCGAGCAGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTT
 GACATGTGAGAACCCCTGGTGAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGC
 TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGGGACT
 CTAATGAGACAGCCGGTACGAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACATCTAGTCACTTTCGGGCTTACATCGTGGGCGA
 CACACGTACTACTGGGCTGGACACAGGGGAGCGAACTCGGGAGAGCGAGCGAATCCCAGCAAACCCGGACTCAAT
 TCA

Estirpe 12 – *Microcystis wesenbergii*

AACACATGCAAGTGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAATTC
 GGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAG
 CTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCT
 GACGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTCTGACGGTAC
 TTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
 GGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTAACATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAA
 CTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACAT
 CGGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAA
 GTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTAT
 GTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGCAACCCTGGTGAAGCTGGGGGTGCC
 TTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCCTCGTCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAGTACAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACAGTACTACAATGGTCGGGACAAAGGCGACCGA
 ACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAG
 GAATCGTAGTAATCGCCGGTACGATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
 GAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAG

Estirpe 13 – *Microcystis wesenbergii*

ATTCTAGTGGCGGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAACTAATTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTG
 CTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAGCTTGGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGA
 AGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGT
 GCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCCGAGGTGGTCAGC
 CAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGC
 AGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACAATCGGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTAT
 CTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTACCCGTAACCGATGGATACT
 AGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGT
 GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAAGACTTGACATGTGCGCAACCCTGGTGAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGG
 CTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTAGTTGCCAGCATT
 AGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTACAGCATGCCCTTAC

GTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAAC
 CCGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACG
 GCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTC
 AACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAG

Estirpe 14 – *Limnothrix* sp.

AGTGGCGGAACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTTCAGGTCGGGGACAACATTGGAAACGAATGCTAATA
 CCCGATGTGCCGCAAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGA
 CTACCAAGGCGATGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTAGGGACGAAGGCCT
 GTGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTCGTAAGT
 CTGTCTTAAAGAGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAGTGCAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAA
 TTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCAGCGAAGGCGTTCTACTGGACCAAACCTGAC
 GCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTG
 TTGCACGTATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCA
 AGGCTTGACATCCTACGAATCCTGGCGAAAAGTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGTAGAGACAGGTGGTGCATGGTGTG
 GTCAGTCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG
 GGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTATCATGCCCTTACGTCTT
 GGGCTACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAGGGCAGCGAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGAAAACCCGGCC
 CCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTGCCCGAAGTCATTAC

Estirpe 15 – *Microcystis aeruginosa*

CGGTGCTACACATGCAAGTGAACGGAATCTTCGGATTCTAGTGCCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCT
 AACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGCCCTGGA
 GAAGAGCTTGGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
 GAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCG
 AAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTG
 ACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGAGGCAAGCGTTATCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGCTCCGAGGTGGTACGCCAAGTCTGCCCTAAATCAGGTTGCTTAAACGACTAAAGGCGG
 TGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAA
 GAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTA
 GATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACG
 CGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
 GAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGACTTGACATGTGCGCAACCCTGGTGAAGCTGGG
 GGTGCCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
 AAGGTGGGATGACGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 CAGCGAACTCGCAGAGCCAGCGAATCCAGCAAAACCCGGCCTCAGTTGAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
 AAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAAGTACGCGGTTGAAATCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCA

Estirpe 16 – *Microcystis aeruginosa*

TAGATTTGATCTTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTGAACGGAATCTTCGGAT
 TCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATAC
 CCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAGCTTGGTGGGGTAAAGGCC
 TACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTT
 TGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCT
 GCCGTCAAATCAGTTGCTTAAACGACCTAAAGGCGGTGGAAGTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATT
 CCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCCGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACA
 CTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATAGGCGT
 GGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
 GACTTGACATGTGCGCAACCCTGGTGAAGCTGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCG
 TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGG
 GACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 GCGGACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGC
 CTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAAGTCAAGTCAAGT

AATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTACCTCAACCGC
AAGGAGGGGGATG

Estirpe 17 – *Microcystis aeruginosa*

CTGGCGCGTGCCTACACATGCAGTGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA
GAATCTAACTTTAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATATGCCGAAGGTGAAACCTAATTGG
CCTGGAGAAGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGCATCAGTACCTGGTCTGA
GAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAAT
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGGGAGGAAGGCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAA
GTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTT
ATCCGGAATTTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGTTGCTTAACGACCTAA
AGGCGGTGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
TGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAG
GGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAG
CTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGGAACCCTGGTGAAA
GCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCGGGAC
AAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCC
TGCATGAAGGAGGAATCGTAGTAATCGCCGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC
CGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCA

Estirpe 18 – *Microcystis aeruginosa*

CGGTGCCTACACATGCAGTGAACGGGAATCTTAGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTA
ACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAAG
AAGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATG
AGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGGGAGGAAGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGAC
GGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTG
GAAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAA
CATCGTGGCGAAAGCGTGTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGATTAGAT
ACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGT
TAAGTATCCCGCCTGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
TATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGGAACCCTGGTAAAAGCTAGGGGT
GCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGACGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCGGGACAAAGGGCAG
CGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
GAGGAATCGTAGTAATCGCCGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC
CATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCA

Estirpe 19 – *Microcystis aeruginosa*

TCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCCTAACACATGCAAGTGAACGGGACTCTTAGGATTCTAGTGGCGGACGGGT
GAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGAAGGT
GAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGGGAGGAAGGCTTTGGATTGTAACCTCTTT
TCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGG
GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGTTG
CTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTA
GGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTAGCCGTAACCGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCGA
GCCGTGCCGAAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCAGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAATTGACGG
GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGGA
ACCCTGGTGAAGCTAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAAC
AATGGTCGGGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGG
CTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTA
AGGCA

Estirpe 21 – *Microcystis wesenbergii*

CAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGT
 GAGTAACGCGTAAGAATCTAATTCAGGACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGT
 GAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGGCAGCATCA
 GTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAAACCTCTTT
 TCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGG
 GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTG
 CTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTA
 GGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGA
 GCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGCA
 ACCCTGGTGAAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTA
 AATGGTCGGGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCGAGG
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGCGGTGAATTCTGTTCCCGGCGCTT
 GTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGA

Estirpe 22 – *Microcystis wesenbergii*

ACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGGAGAAGA
 GCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCA
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTTCTGACGGTA
 CTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
 GGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAA
 CTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATTGGGAAGAACAT
 CGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAA
 GTATCCCGCCTGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGTAT
 GTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGACTTGACATGTGCGAACCCTGGTAAAAGCTGGGGGTGCC
 TTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTCGTTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTAACAATGGTCCGGGACAAAGGGCAGCGA
 ACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAG
 GAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATAACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGCGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
 GAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAANGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGA
 AGTCGTAAC

Anexo III

As imagens seguintes referem-se aos espectros obtidos por MALDI-TOF MS para as amostras ambientais (figuras 1 a 10) e para as estirpes cultivadas (figuras 11 a 17).

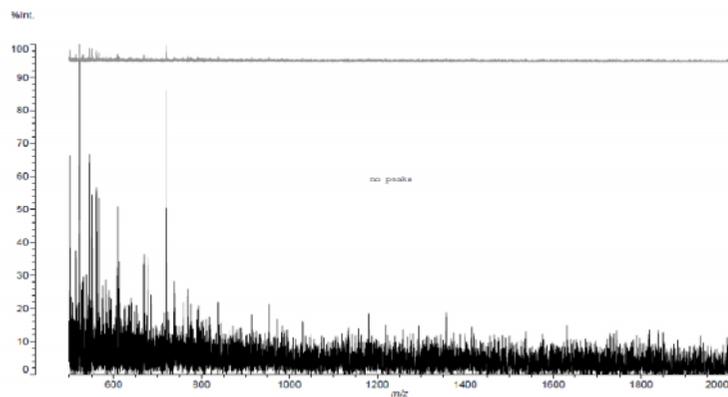


Figura 20 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco a 19 de Setembro

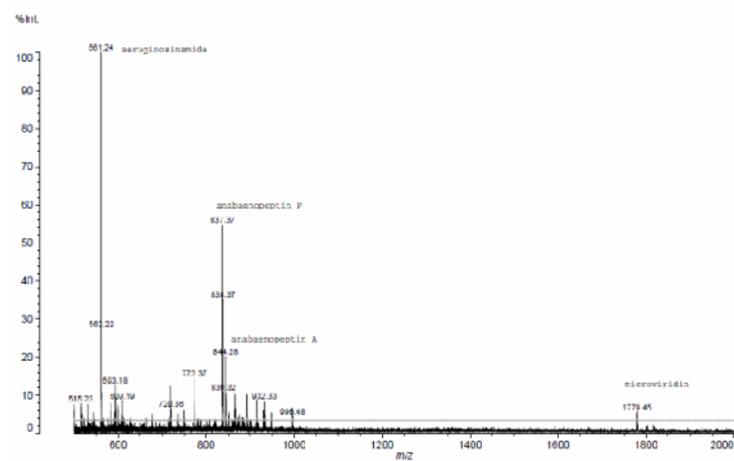


Figura 21 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco a 1 de Outubro

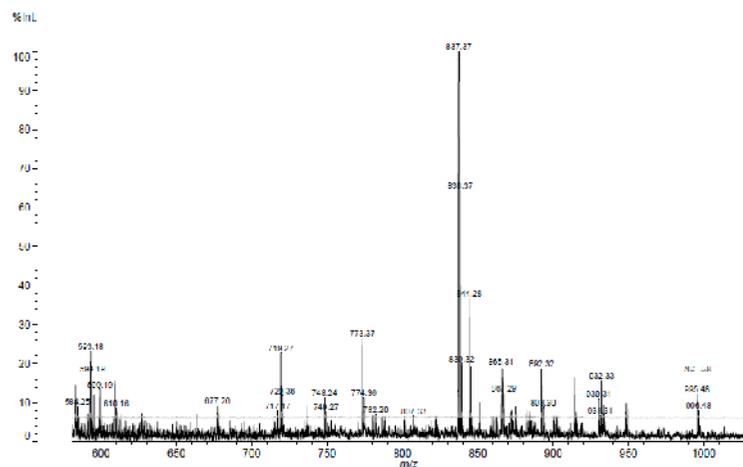


Figura 22 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco a 1 de Outubro

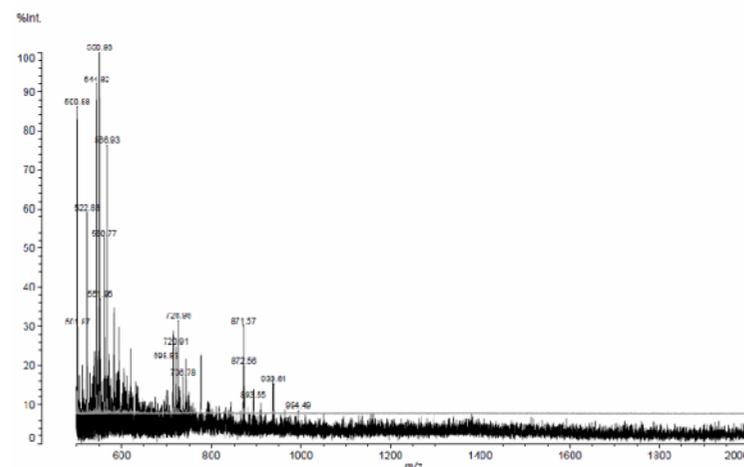


Figura 24 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco a 29 de Outubro

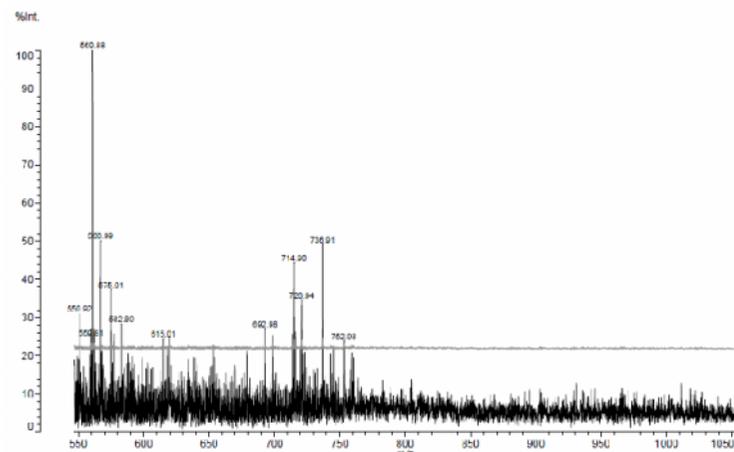


Figura 23 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Marco a 15 de Outubro

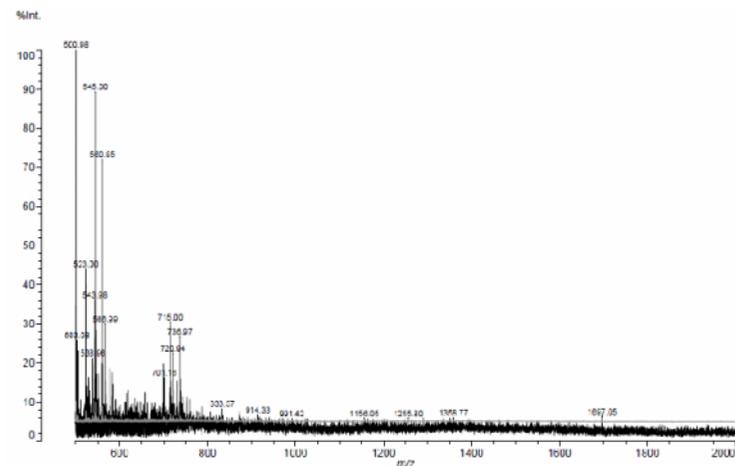


Figura 25 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Torrão a 19 de Setembro

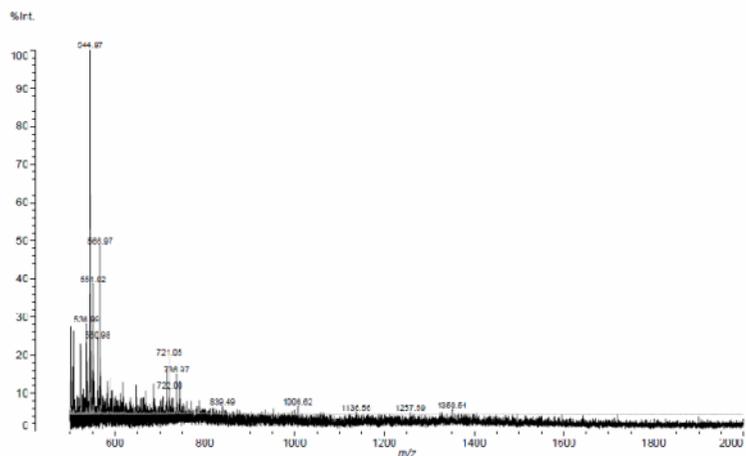


Figura 26 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Torrão a 1 de Outubro

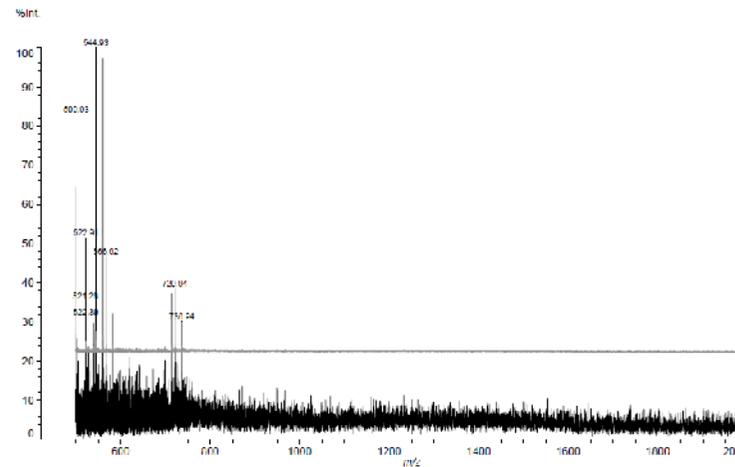


Figura 28 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Torrão a 29 de Outubro

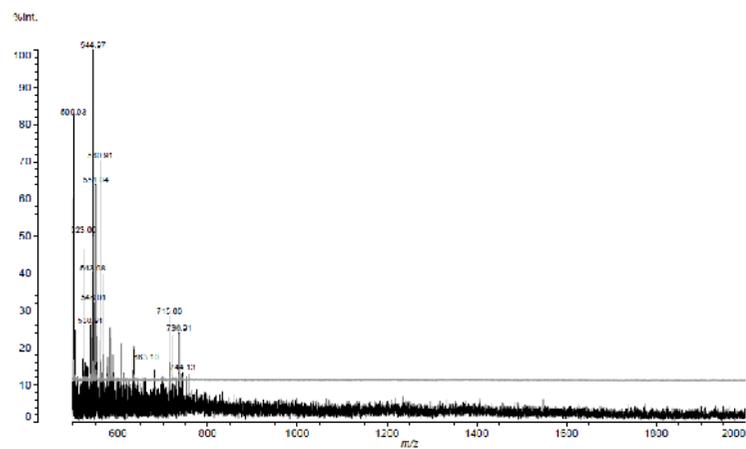


Figura 27 - Espectro de MALDI-TOF MS para a amostra ambiental do Torrão a 15 de Outubro

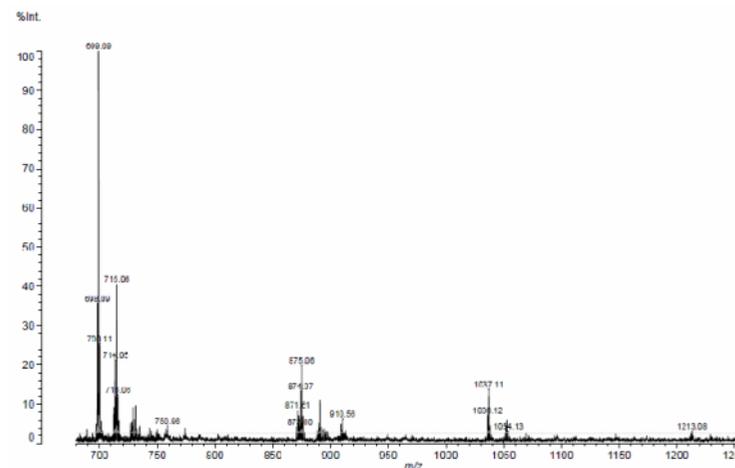


Figura 29 - Espectro de MALDI-TOF MS para a estirpe 1 (*Aphanizomenon flos-aquae*)

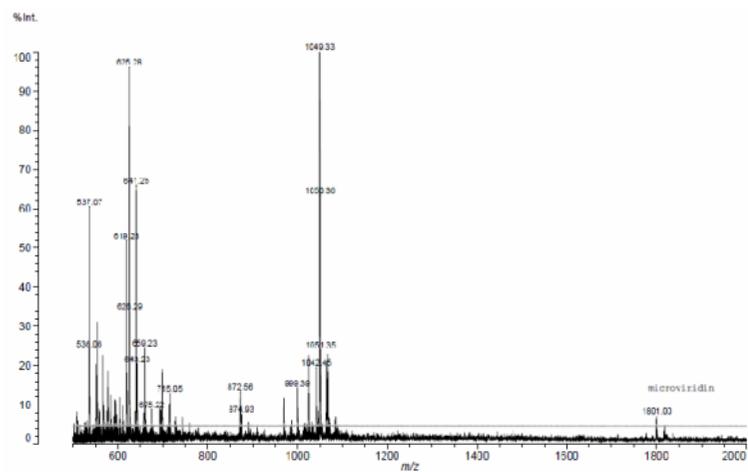


Figura 30 - Espectro de MALDI-TOF MS para a estirpe 9 (*Microcystis aeruginosa*)

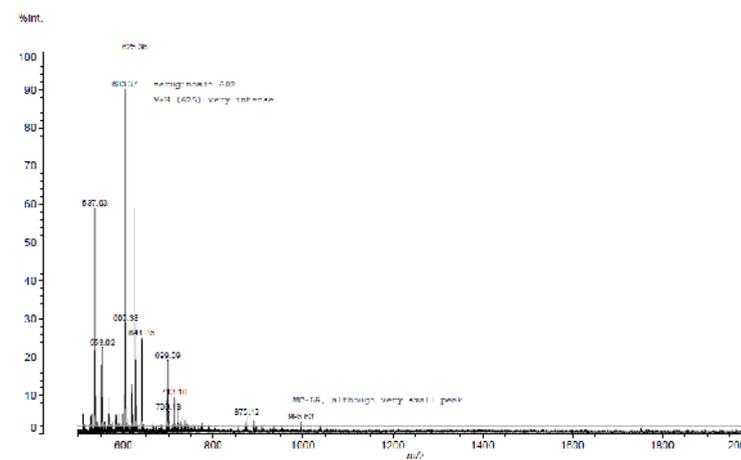


Figura 32 - Espectro de MALDI-TOF MS para a estirpe 16 (*Microcystis aeruginosa*)

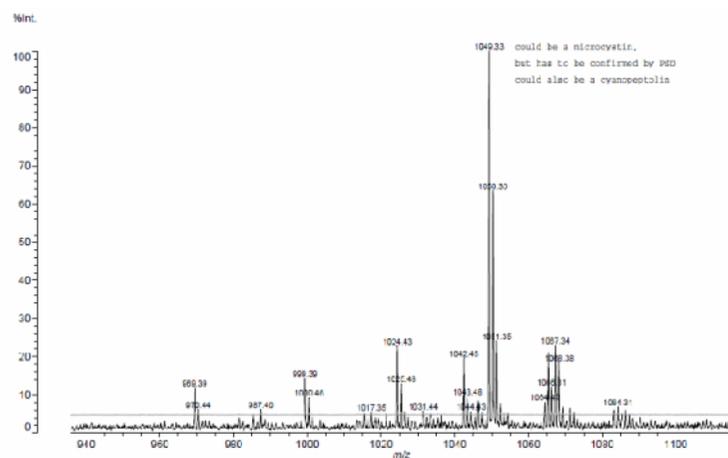


Figura 31 - Espectro de MALDI-TOF MS para a estirpe 9 (*Microcystis aeruginosa*)

Anexo IV

As imagens seguintes referem-se às curvas dos “melting peaks” obtidos nas diferentes reacções de PCR em tempo real.

As figuras 1 a 4 referem-se aos resultados obtidos para as amostras padrão. As figuras 5 a 8 referem-se aos resultados para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização dos volumes.

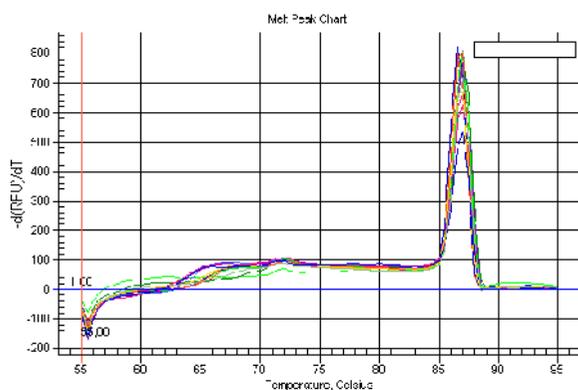


Figura 33 – “Melting Peaks” da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras padrão, para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA. “Melting temperature” de $87\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

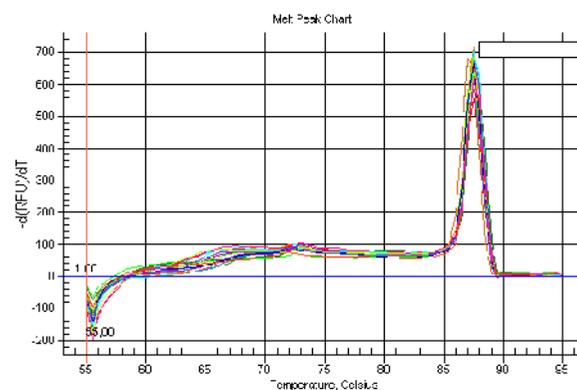


Figura 34 - “Melting Peaks” da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras padrão, para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA específico de *Microcystis*. “Melting temperature” de $87\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

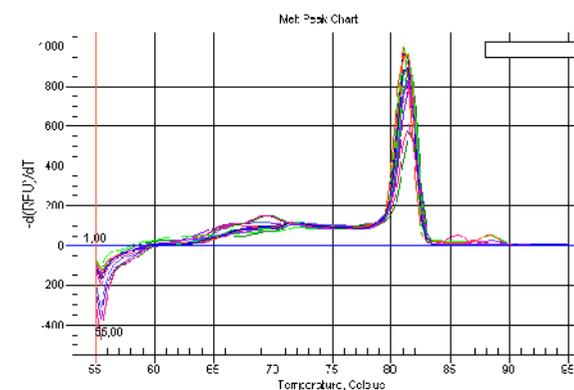


Figura 35 - “Melting Peaks” da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras padrão, para amplificação de um fragmento do gene da microcistina sintetase (mcyA). “Melting temperature” de $82\pm 1^{\circ}\text{C}$.

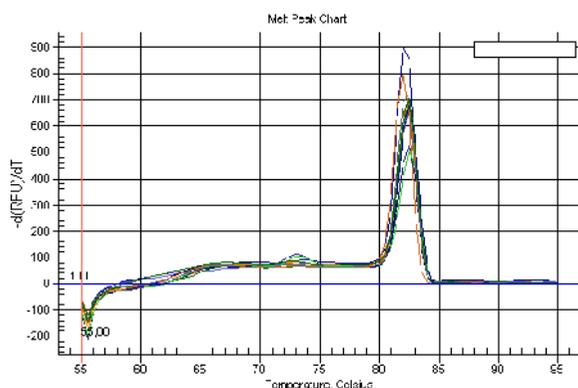


Figura 36 - "Melting Peaks" da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras padrão, para amplificação de um fragmento do gene da microcistina sintetase B (mcyB). "Melting temperature" de $82 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

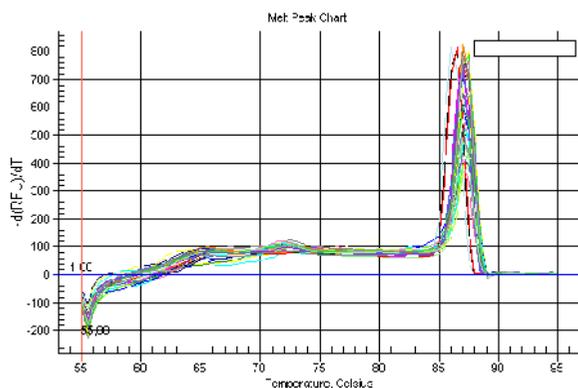


Figura 37 - "Melting Peaks" da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização do volume, para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA.

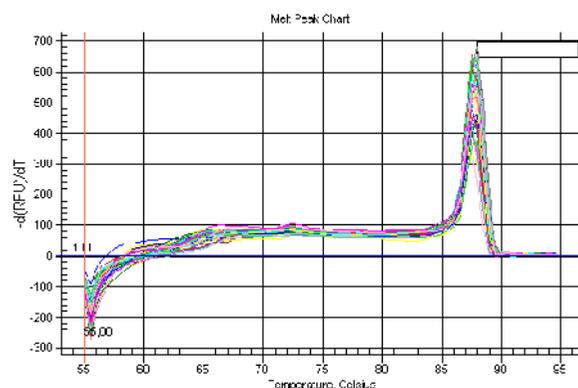


Figura 38 - "Melting Peaks" da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização dos volumes, para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA específico de *Microcystis*.

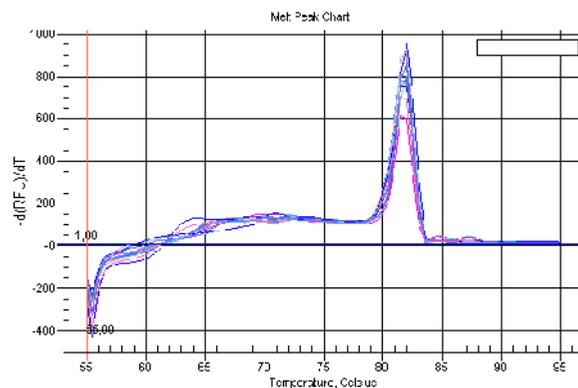


Figura 39 - "Melting Peaks" da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização do volume, para amplificação de um fragmento do gene da microcistina sintetase (mcyA).

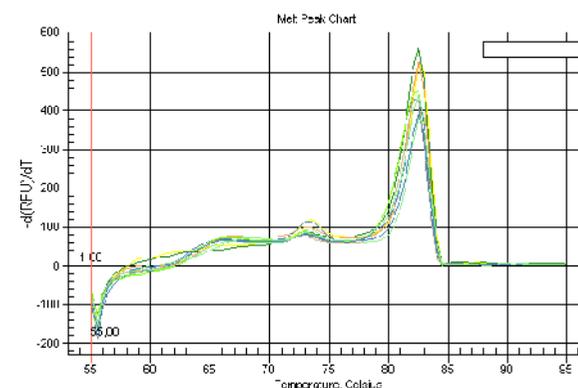


Figura 40 - "Melting Peaks" da reacção de PCR em Tempo Real para as amostras ambientais e amostras ambientais para optimização do volume, para amplificação de um fragmento do gene da microcistina sintetase específico de *Microcystis* (mcyB).