

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

Avaliação da Resistência a Antibióticos em Estirpes de Cianobactérias Isoladas de Ambientes Hídricos

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Micaela de Almeida Carrapato Oliveira

Dissertação orientada por:
Doutora Elsa Dias
Doutora Deodália Dias

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

**Avaliação da Resistência a Antibióticos em Estirpes de
Cianobactérias Isoladas de Ambientes Hídricos**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Micaela de Almeida Carrapato Oliveira

Dissertação orientada por:
Doutora Elsa Dias
Doutora Deodália Dias

2015

Notas Prévias

As referências bibliográficas desta dissertação estão de acordo com as normas da revista *Frontiers in Microbiology*.

A redacção desta dissertação não seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

Este trabalho deu origem às seguintes publicações e comunicações:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Dias, E., **Oliveira, M.**, Jones-Dias, D., Vasconcelos, V., Ferreira, E., Manageiro, V., Caniça, M. (2015). Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater Cyanobacteria spp. *Front. Microbiol.* 6:799. doi: 10.3389/fmicb.2015.00799

Comunicações orais em conferências internacionais

Dias, E., Oliveira, M., Jones-Dias, D., Vasconcelos, V., Caniça, M. (2015). Susceptibilidade reduzida a antibióticos e genes de resistência em cianobactérias de água doce superficial e residual. 4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas (4CIC), Lisboa, Portugal, 8-10 Julho 2015.

Comunicações em painel em conferências internacionais

Elsa Dias, **Micaela Oliveira**, Daniela Jones-Dias, Vera Manageiro, Catarina Churro, Vitor Vasconcelos, Eugénia Ferreira, Manuela Caniça. (2015). Minimum inhibitory concentrations and antibiotic resistant genes in the freshwater cyanobacteria *Planktothrix agardhii* (P89). 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2015), Tours, France, 29 June-1 July 2015.

Agradecimentos

À Doutora Elsa Dias, por me ter orientado ao longo deste último ano, por tudo aquilo que me ensinou e por toda a disponibilidade que sempre teve para mim. Sem ela, este trabalho não teria sido possível. Obrigada, Elsa!

À Doutora Deodália Dias, por todo o apoio que me prestou e por toda a disponibilidade que sempre teve para me aconselhar e para responder às minhas questões.

À Doutora Manuela Caniça, por me ter sugerido este tema, pela forma como me recebeu no seu laboratório e por todo o interesse que demonstrou em acompanhar o meu trabalho e os meus resultados, incentivando-me sempre a ir mais além.

Às minhas colegas do ASBE, em especial à Carina e à Catarina, pela sua amizade, por tudo o que me ensinaram e pela disponibilidade que sempre tiveram para me ajudar no que fosse preciso.

Às minhas colegas da URRR, em especial à Daniela, pela sua inesgotável paciência e disponibilidade para me ensinarem e tirarem dúvidas sobre tudo e mais alguma coisa.

Aos meus amigos, em especial à Catarina, ao Filipe, ao Guilherme e à Rita, por todos os bons momentos que passámos juntos ao longo deste último ano.

À minha família, em especial aos meus pais, por apoiarem incondicionalmente as minhas escolhas e por me terem proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Rafael, por ter estado sempre comigo, nos bons e nos maus momentos, por toda a ajuda e por todo o incentivo que sempre me deu e por todos os bons momentos que passámos juntos e que tão importantes foram para mim.

Sumário

Os ambientes hídricos constituem veículos para a emergência e disseminação da resistência a antibióticos. As cianobactérias encontram-se amplamente distribuídas nestes ambientes, estando frequentemente expostas a antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência. Contudo, o seu papel no resistoma hídrico nunca foi investigado. Este trabalho pretendeu avaliar a susceptibilidade de oito estirpes de *Microcystis aeruginosa*, oito estirpes de *Planktothrix agardhii* e oito estirpes de *Planktothrix mougeotii* a diferentes antibióticos (amoxicilina, ceftazidima, ceftriaxona, canamicina, gentamicina, tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacina e trimetoprim). Para tal, foi utilizado um procedimento baseado no método *standard Broth Microdilution* para bactérias, no qual as cianobactérias foram expostas a diluições sucessivas de cada antibiótico em meio Z8 (0,0015 mg/L – 1,6 mg/L) e mantidas numa câmara de culturas sob ciclos de 14 horas de luz – com uma intensidade de $16 \pm 4 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ – e 10 horas de escuro, a uma temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. O crescimento celular foi seguido durante 14 dias (observação macroscópica, microscópica e leitura da $\text{DO}_{450\text{nm}}$) e as concentrações inibitórias mínimas de cada antibiótico (CIMs) foram calculadas para cada estirpe. Nenhuma das estirpes foi susceptível a qualquer das concentrações de ácido nalidíxico e de trimetoprim testadas. Adicionalmente, as estirpes de *M. aeruginosa* apresentaram uma susceptibilidade reduzida à tetraciclina, as estirpes de *P. agardhii* apresentaram uma susceptibilidade reduzida à norfloxacina e as estirpes de *P. mougeotii* não foram susceptíveis à amoxicilina nem à norfloxacina e apresentaram uma susceptibilidade reduzida à tetraciclina. Foi também pesquisada a presença de genes e de integrões associados à resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo por PCR e posterior sequenciação dos produtos obtidos. Foram encontrados genes de resistência à estreptomicina numa estirpe de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em quatro estirpes de *P. mougeotii*; genes de resistência às sulfonamidas em quatro estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em cinco estirpes de *P. mougeotii*; integrões de classe 1 em duas estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em três estirpes de *P. mougeotii*. Adicionalmente, o gene *qac*ΔE foi encontrado numa estirpe de *M. aeruginosa* e numa estirpe de *P. agardhii*. Os resultados obtidos sugerem que as cianobactérias apresentam resistência intrínseca a alguns antibióticos e que, de acordo com o seu local de origem, podem apresentar resistência adquirida a outros. Assim, tudo indica que, de facto, as cianobactérias desempenham um papel importante no resistoma hídrico.

Palavras-chave: Cianobactérias, antibióticos, resistoma hídrico, concentrações inibitórias mínimas, determinantes genéticos de resistência a antibióticos.

Abstract

Water environments are vehicles for the emergence and dissemination of antibiotic resistance. Cyanobacteria are widely distributed in these environments, where they are often exposed to antibiotics, antibiotic resistant bacteria and resistance genes. However, their role on water resistome was never investigated. This work aimed to evaluate the susceptibility of eight *Microcystis aeruginosa* strains, eight *Planktothrix agardhii* strains and eight *Planktothrix mougeotii* strains to different antibiotics (amoxicillin, ceftazidime, ceftriaxone, kanamycin, gentamicin, tetracycline, nalidixic acid, norfloxacin and trimethoprim). For this purpose, it was used a procedure based on the standard Broth Microdilution method for bacteria, in which the cyanobacteria were exposed to serial dilutions of each antibiotic in Z8 medium (0,0015 mg/L – 1,6 mg/L) and kept in a culture chamber under cycles of 14 hours light – with an intensity of $16 \pm 4 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ – and 10 hours dark, at a temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Cell growth was followed for 14 days (macroscopic and microscopic observation and determination of $\text{DO}_{450\text{nm}}$) and the minimum inhibitory concentrations of each antibiotic (MICs) were calculated for each strain. None of the strains were susceptible to any of the tested concentrations of nalidixic acid and trimethoprim. Additionally, *M. aeruginosa* strains showed a reduced susceptibility to tetracycline, *P. agardhii* strains showed a reduced susceptibility to norfloxacin and *P. mougeotii* strains were not susceptible to amoxicillin and norfloxacin and showed a reduced susceptibility to tetracycline. It was also investigated the presence of antibiotic resistance genes and integrons in the studied cyanobacteria by PCR and subsequent sequencing of the PCR products. Streptomycin resistance genes were found in one *M. aeruginosa* strain, in three *P. agardhii* strains and in four *P. mougeotii* strains; sulfonamide resistance genes were found in four *M. aeruginosa* strains, in three *P. agardhii* strains and in five *P. mougeotii* strains; class 1 integrons were found in two *M. aeruginosa* strains, in three *P. agardhii* strains and in three *P. mougeotii* strains. Additionally, the *qac* Δ E gene was found in one *M. aeruginosa* strain and in one *P. agardhii* strain. The results suggest that cyanobacteria exhibit intrinsic resistance to some antibiotics and that, depending on their origin, they can acquire resistance to others. Thus, it seems that, in fact, cyanobacteria play an important role in water resistome.

Keywords: Cyanobacteria, antibiotics, water resistome, minimum inhibitory concentrations, antibiotic resistance determinants.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Sumário	ii
Abstract	iii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	viii
1. Introdução	1
1.1. Problemática da resistência a antibióticos	2
1.2. Mecanismos de acção e classes de antibióticos	3
1.3. Mecanismos de resistência às diferentes classes de antibióticos	5
1.4. Os ambientes hídricos como reservatórios de antibióticos e de genes de resistência	8
1.5. Distribuição geográfica dos genes de resistência a antibióticos em ambientes hídricos	10
1.6. As cianobactérias	11
1.7. Objectivos.....	15
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Cianobactérias estudadas	17
2.1.1. Espécies e estirpes cianobacterianas	17
2.1.2. Manutenção das culturas cianobacterianas	19
2.2. Antibióticos testados.....	19
2.3. Avaliação do fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos	20
2.3.1. Preparação dos antibióticos.....	20
2.3.2. Preparação dos inóculos cianobacterianos.....	22
2.3.3. Exposição das cianobactérias aos antibióticos.....	23
2.3.4. Análise do crescimento cianobacteriano e determinação das concentrações inibitórias mínimas.....	25
2.3.5. Controlo da qualidade dos antibióticos	26
2.4. Pesquisa de genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo	28
2.4.1. Extração e quantificação do ADN cianobacteriano	28
2.4.2. Pesquisa de genes de resistência a antibióticos por PCR.....	28
2.4.3. Purificação dos produtos de PCR	30
2.4.4. Sequenciação dos produtos de PCR.....	31
3. Resultados	32

3.1. Observação macroscópica e microscópica das culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos.....	33
3.2. Curvas dose-resposta	33
3.2.1. Antibióticos β -lactâmicos.....	33
3.2.2. Aminoglicosídeos	35
3.2.3. Tetraciclinas.....	37
3.2.4. Quinolonas	38
3.2.5. Diaminopiridinas	40
3.3. Concentrações inibitórias mínimas	41
3.4. Controlo da qualidade dos antibióticos	44
3.5. Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo.....	44
4. Discussão.....	47
4.1. Fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos	48
4.1.1. Antibióticos β -lactâmicos.....	48
4.1.2. Aminoglicosídeos	50
4.1.3. Tetraciclinas.....	51
4.1.4. Quinolonas	52
4.1.5. Diaminopiridinas	53
4.2. Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo.....	54
5. Conclusões.....	57
6. Bibliografia	59
7. Anexos	69
7.1. Anexo I – Composição do meio de cultura Z8.....	70
7.2. Anexo II – Fotografias das microplacas contendo as culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos	71

Índice de Figuras

Figura 1 Mecanismos de acção / alvos das diferentes classes de antibióticos.....	4
Figura 2 Mecanismos de transformação, transdução e conjugação bacteriana entre estirpes de uma mesma espécie ou entre estirpes de espécies ou géneros diferentes	6
Figura 3 Principais mecanismos de resistência aos antibióticos.....	7
Figura 4 Actividades antropogénicas que resultam na libertação de antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência para os ambientes hídricos	9
Figura 5 Distribuição geográfica de alguns genes de resistência a antibióticos nos ambientes hídricos europeus.....	10
Figura 6 Colónias de <i>Microcystis aeruginosa</i>	12
Figura 7 Colónias de <i>Planktothrix agardhii</i>	12
Figura 8 Colónias de <i>Planktothrix mougeotii</i>	12
Figuras 9a e 9b Florescência de cianobactérias nas águas da albufeira de Magos	14
Figura 10 Culturas de <i>M. aeruginosa</i> estudadas.....	19
Figura 11 Culturas de <i>P. agardhii</i> estudadas.....	19
Figura 12 Culturas de <i>P. mougeotii</i> estudadas.....	19
Figura 13 Primeiro passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos.....	23
Figura 14 Segundo passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos.....	24
Figura 15 Terceiro passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos	24
Figura 16 Intervalo de concentrações de antibióticos ao qual cianobactérias em estudo foram expostas	25
Figura 17 Representação esquemática do teste de controlo da qualidade dos antibióticos ..	28
Figura 18 Curvas dose-resposta de <i>M. aeruginosa</i> para os antibióticos β -lactâmicos	34
Figura 19 Curvas dose-resposta de <i>P. agardhii</i> para os antibióticos β -lactâmicos.....	34
Figura 20 Curvas dose-resposta de <i>P. mougeotii</i> para os antibióticos β -lactâmicos	35
Figura 21 Curvas dose-resposta de <i>M. aeruginosa</i> para os aminoglicosídeos	35
Figura 22 Curvas dose-resposta de <i>P. agardhii</i> para os aminoglicosídeos	36
Figura 23 Curvas dose-resposta de <i>P. mougeotii</i> para os aminoglicosídeos	36
Figura 24 Curvas dose-resposta de <i>M. aeruginosa</i> para as tetraciclinas.....	37
Figura 25 Curvas dose-resposta de <i>P. agardhii</i> para as tetraciclinas.....	37
Figura 26 Curvas dose-resposta de <i>P. mougeotii</i> para as tetraciclinas.....	38
Figura 27 Curvas dose-resposta de <i>M. aeruginosa</i> para as quinolonas.....	38
Figura 28 Curvas dose-resposta de <i>P. agardhii</i> para as quinolonas.....	39
Figura 29 Curvas dose-resposta de <i>P. mougeotii</i> para as quinolonas.....	39

Figura 30 Curvas dose-resposta de <i>M. aeruginosa</i> para as diaminopiridinas	40
Figura 31 Curvas dose-resposta de <i>P. agardhii</i> para as diaminopiridinas	40
Figura 32 Curvas dose-resposta de <i>P. mougeotii</i> para as diaminopiridinas	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 Antibióticos para os quais foram detectados genes de resistência em ambientes hídricos portugueses.....	11
Tabela 2 Estirpes de <i>M. aeruginosa</i> estudadas e caracterização das respectivas albufeiras de origem	18
Tabela 3 Estirpes de <i>P. agardhii</i> estudadas e caracterização das respectivas albufeiras de origem	18
Tabela 4 Características dos antibióticos testados	20
Tabela 5 Preparação das soluções <i>stock</i> e de trabalho dos antibióticos testados	21
Tabela 6 CIMs <i>standard</i> (mg/L) dos antibióticos testados para as estirpes padrão de <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>S. aureus</i> (ATCC 29213).....	27
Tabela 7 PCRs realizados para pesquisar a presença de genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo	29
Tabela 8 CIMs (mg/L) dos antibióticos testados para as 24 estirpes em estudo.....	43
Tabela 9 CIMs (mg/L) dos antibióticos testados para as estirpes padrão de <i>E.coli</i> (ATCC 25922) e <i>S. aureus</i> (ATCC 29213), após manutenção das soluções de antibiótico nas condições de cultura das cianobactérias durante 0, 1, 7 e 14 dias.....	44
Tabela 10 Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo	45

1. Introdução

1.1. Problemática da resistência a antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas, de origem natural ou sintética, capazes de estabelecer interações específicas com estruturas-alvo bacterianas e de induzir a inibição da multiplicação ou a destruição destes micro-organismos, sem que daí advenham efeitos tóxicos para humanos e animais (Davies e Davies, 2010; INSARJ, 2010).

Com uma ampla utilização na prevenção e no tratamento de infecções desde a eclosão da Segunda Guerra Mundial (NIAID, 2006; Wright, 2010), estes compostos são considerados um dos grandes pilares e uma das grandes conquistas da medicina moderna, uma vez que permitiram que fossem salvas inúmeras vidas e ultrapassadas as mais diversas complicações geradas por infecções causadoras de doenças graves e de mortes prematuras na chamada “era pré-antibiótica” (NIAID, 2006; Hawkey, 2008; Davies e Davies, 2010; Wright, 2010).

Contudo, e após dezenas de anos de uso generalizado, a eficácia terapêutica destas drogas encontra-se fortemente ameaçada, já que um número crescente de bactérias patogénicas tem vindo a adquirir elaborados mecanismos de resistência, que levam à redução ou até mesmo à supressão da acção dos antibióticos (Levy e Marshall, 2004; Hawkey, 2008; Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010; Usha et al., 2010). Muitas destas bactérias apresentam resistência a, pelo menos, um dos antibióticos mais comumente utilizados no seu tratamento, sendo que, algumas delas apresentam resistência a mais do que um ou até mesmo a todos os antibióticos aprovados, pelo que as infecções associadas podem apenas ser tratadas com recurso a drogas experimentais e potencialmente tóxicas para os pacientes (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010).

A resistência a antibióticos tem vindo a tornar-se num grave problema de saúde pública a nível global (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009; Hawkey e Jones, 2009; Usha et al., 2010), e parece ser a forte pressão selectiva resultante da exposição contínua das bactérias a estas substâncias que leva à propagação de estirpes naturalmente resistentes e à aquisição de resistências em estirpes, até então, sensíveis (Levy e Marshall, 2004; NIAID, 2006; Hawkey, 2008; Bisht et al., 2009; Martinez, 2009; Davies e Davies, 2010; Usha et al., 2010; Wright, 2010). Assim, a grande força motriz da aquisição de resistência a antibióticos por parte das bactérias está no uso generalizado e, muitas vezes, incorrecto destes compostos nos hábitos terapêuticos de humanos e animais, decorrente de prescrições médicas inapropriadas, da venda de antibióticos sem prescrição médica, de períodos de toma mais curtos ou mais longos do que o necessário e da toma de dosagens mais baixas ou mais altas do que as necessárias (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010; Usha et al., 2010).

Adicionalmente, estas drogas são também utilizadas em actividades como a agricultura, a pecuária e a aquacultura, o que contribui ainda mais para a disseminação de resistências (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010).

1.2. Mecanismos de acção e classes de antibióticos

A base da terapia antimicrobiana reside no conceito da toxicidade selectiva, ou seja, na capacidade que o antibiótico tem de ser tóxico para o agente patogénico-alvo, mas inócuo para o hospedeiro (Greenwood e Whitley, 1997). Esta selectividade tóxica pode ser alcançada por uma de duas formas distintas: os alvos existentes nos micro-organismos não se encontram presentes nas células do hospedeiro, como é o caso da parede celular bacteriana, ou os alvos análogos presentes nas células do hospedeiro são suficientemente diferentes ou estão suficientemente inacessíveis à acção do antibiótico, como é o caso dos ribossomas, dos ácidos nucleicos, das vias metabólicas e das membranas celulares (Greenwood e Whitley, 1997; Wright, 2010).

Assim, e de acordo com os seus mecanismos de acção, a grande maioria dos antibióticos pertence a um de cinco grandes grupos: antibióticos que interferem com a síntese da parede celular bacteriana, antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana, antibióticos que interferem com a síntese de ácidos nucleicos bacterianos, antibióticos que inibem vias metabólicas bacterianas e antibióticos que rompem a estrutura da membrana celular bacteriana (**Figura 1**) (Greenwood e Whitley, 1997; Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010).

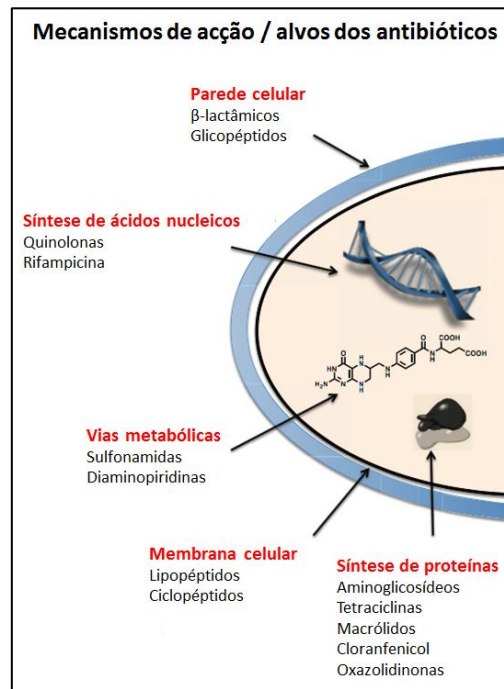


Figura 1 | Mecanismos de acção / alvos das diferentes classes de antibióticos (Adaptado de Wright, 2010).

De entre os antibióticos que interferem com a síntese da parede celular bacteriana, são de destacar: os β-lactâmicos, que inactivam as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que catalisam as ligações cruzadas envolvendo o dipéptido C-terminal D-Ala-D-Ala da cadeia nascente do peptidoglicano, necessárias para a síntese de uma parede celular estável (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Bush, 2012); os glicopéptidos, que formam um complexo com o dipéptido C-terminal D-Ala-D-Ala da cadeia nascente do peptidoglicano, impedindo a ocorrência das reacções de transglicosilação e transpeptidação necessárias para a sua finalização (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Bush, 2012).

Em relação aos antibióticos que inibem a síntese proteica bacteriana, importa referir: os aminoglicosídeos e as tetraciclina, que impedem a formação do péptido pela ligação a estruturas da subunidade 30S do ribossoma (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Lambert, 2012); os macrólidos, o cloranfenicol e as oxazolidinonas, que impedem a formação do péptido pela ligação a estruturas da subunidade 50S do ribossoma (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Lambert, 2012).

Os antibióticos que interferem com a síntese de ácidos nucleicos bacterianos incluem: as quinolonas, que impedem a replicação e a transcrição do ADN pela inibição das topoisomerasas do tipo II bacterianas (a ADN girase e a topoisomerase IV) (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012); a rifampicina, que impede o início da

transcrição do ADN pela ligação à subunidade β da ARN polimerase dependente de ADN (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012).

No caso dos antibióticos que inibem vias metabólicas bacterianas, destacam-se: as sulfonamidas, que inibem a acção do enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), que catalisa a síntese de ácido dihidropteróico (DHP) a partir de ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e pteridina (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012); as diaminopiridinas, que inibem a acção do enzima dihidrofolato reductase (DHFR), que catalisa a síntese de ácido tetrahidrofólico (THF) a partir de ácido dihidrofólico (DHF) (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012). As sulfonamidas e as diaminopiridinas inibem diferentes etapas do metabolismo do ácido fólico, podendo actuar em sinergia para reduzir a probabilidade de resistência por parte dos micro-organismos (Bockstael e Aerschot, 2009).

Por fim, aos antibióticos que rompem a estrutura da membrana celular bacteriana, pertencem: os lipopéptidos, que causam uma despolarização da membrana celular dependente de cálcio, provocando a cessação da síntese de macromoléculas e a disrupção desta estrutura (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Bush, 2012); os ciclopéptidos, que se ligam ao lípido A do lipopolissacárido da membrana celular, levando à desintegração da mesma (Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Bush, 2012).

1.3. Mecanismos de resistência às diferentes classes de antibióticos

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a determinado antibiótico ou classe de antibióticos ou adquirir essa resistência por via de um de dois processos distintos: mutação espontânea e selecção ou transferência horizontal de genes (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013; Blair et al., 2015).

Algumas espécies bacterianas são intrinsecamente resistentes a um ou até mesmo a mais do que um antibiótico ou classe de antibióticos, ou seja, resistem à acção destas drogas apenas devido às suas características estruturais e / ou funcionais (Tenover, 2006; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013; Blair et al., 2015).

Contudo, é a resistência adquirida que representa o maior e o mais preocupante tipo de resistência a antibióticos, uma vez que populações bacterianas inicialmente susceptíveis se tornam resistentes a determinado antibiótico ou classe de antibióticos e proliferam, em resposta à forte pressão selectiva resultante da exposição a estas substâncias (Tenover, 2006; Bockstael e Aerschot, 2009). A transferência horizontal de genes representa o modo mais

frequente de aquisição de resistência a antibióticos, podendo dar-se pelos mecanismos de conjugação, transdução ou transformação entre estirpes de uma mesma espécie ou entre estirpes de espécies ou géneros diferentes (**Figura 2**) (Furuya e Lowy, 2006; Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Blair et al., 2015).

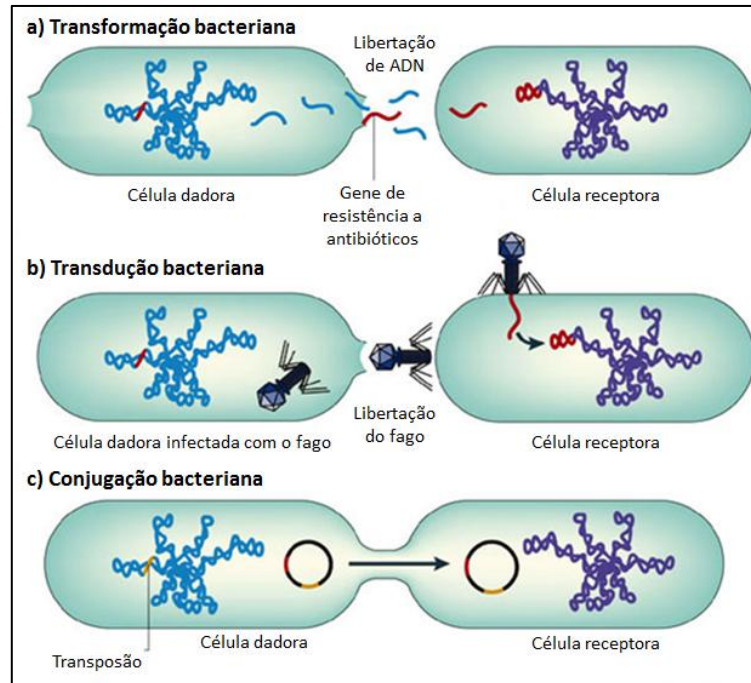


Figura 2 | Mecanismos de transformação, transdução e conjugação bacteriana entre estirpes de uma mesma espécie ou entre estirpes de espécies ou géneros diferentes (Adaptado de Furuya e Lowy, 2006).

Ainda que o modo de aquisição de resistência possa variar entre espécies e géneros bacterianos, os principais mecanismos de resistência são relativamente poucos e comuns à maioria das bactérias (Džidić et al., 2008): a inativação do antibiótico, a modificação das características da estrutura-alvo do antibiótico, a redução da concentração do antibiótico no interior da célula e a utilização de vias metabólicas alternativas (**Figura 3**) (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013).

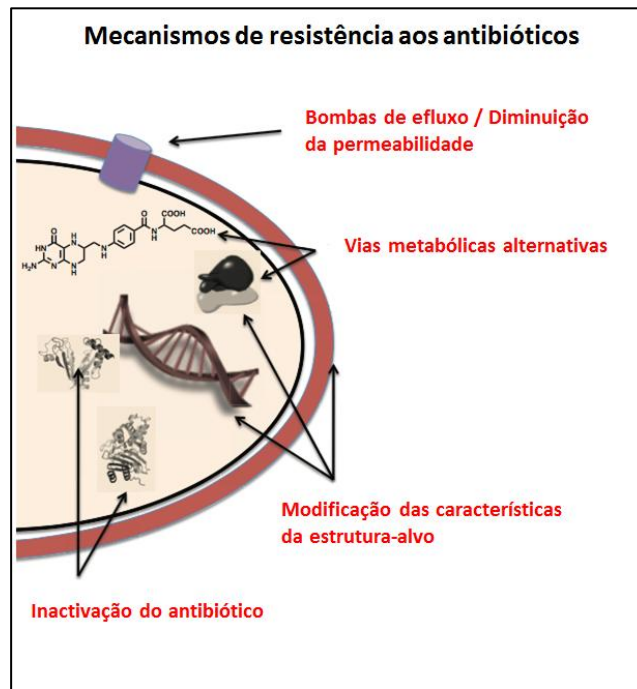


Figura 3 | Principais mecanismos de resistência aos antibióticos (Adaptado de Wright, 2010).

A inativação do antibiótico consiste no processo de produção de enzimas que promovem a sua degradação ou modificação através de hidrólise, transferência de grupos ou mecanismos redox (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013); a modificação das características da estrutura-alvo do antibiótico leva à perda de afinidade entre ambos e à incapacidade do antibiótico se ligar e actuar correctamente (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013); a redução da concentração de antibiótico no interior da célula pode ser conseguida pela acção de bombas de efluxo, que o exportam para fora da célula, ou pela diminuição da permeabilidade membranar, que resulta numa redução da sua absorção (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Kumar e Varela, 2013); a utilização de vias metabólicas alternativas permite a síntese das moléculas necessárias à sobrevivência da bactéria, uma vez que os enzimas envolvidos nestas vias não são afectados pela acção do antibiótico (Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010).

O mecanismo de resistência que prevalece em cada bactéria depende de factores como a natureza e os alvos do antibiótico, a espécie bacteriana em questão e o modo pelo qual a resistência foi adquirida (mutação espontânea ou transferência horizontal de genes) (Džidić et al., 2008).

1.4. Os ambientes hídricos como reservatórios de antibióticos e de genes de resistência

Apesar de os antibióticos serem amplamente utilizados há várias décadas, só mais recentemente começou a ser dada maior atenção aos problemas causados pela sua presença no meio ambiente e, mais concretamente, nos ambientes hídricos (Kümmerer, 2004).

O consumo generalizado de antibióticos em áreas como a medicina humana e veterinária, associado ao facto de estes não serem completamente metabolizadas pelos organismos, traduz-se na presença de concentrações bastante elevadas dos mais diversos compostos activos destas substâncias nos efluentes urbanos e agropecuários (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2009; Martinez, 2009; Mojica e Aga, 2011; Bouki et al., 2013; Marti et al., 2014). Uma vez chegados às estações de tratamento de águas residuais (ETARs), os resíduos de antibióticos presentes nos efluentes são apenas parcialmente eliminados durante o processo de purificação, o que resulta na contaminação do meio ambiente e, em especial, dos ambientes hídricos, por parte da fracção não eliminada destes compostos (**Figura 4**) (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2009; Martinez, 2009; Mojica e Aga, 2011; Marti et al., 2014). Entre os casos que suscitam maior preocupação, salientam-se os efluentes provenientes de hospitais e de instalações de criação animal intensiva que, para além de representarem focos de libertação de grandes quantidades de antibióticos para os ambientes hídricos, representam ainda fontes importantes de bactérias resistentes e de genes de resistência (Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2009; Martinez, 2009; Marti et al., 2014).

Por outro lado, o escoamento e as descargas provenientes de outras actividades onde os antibióticos são também amplamente utilizados, tais como a agricultura, a pecuária e a aquacultura, representam igualmente importantes fontes de antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência que são libertados para os ambientes hídricos (**Figura 4**) (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2009; Martinez, 2009; Mojica e Aga, 2011; Marti et al., 2014).

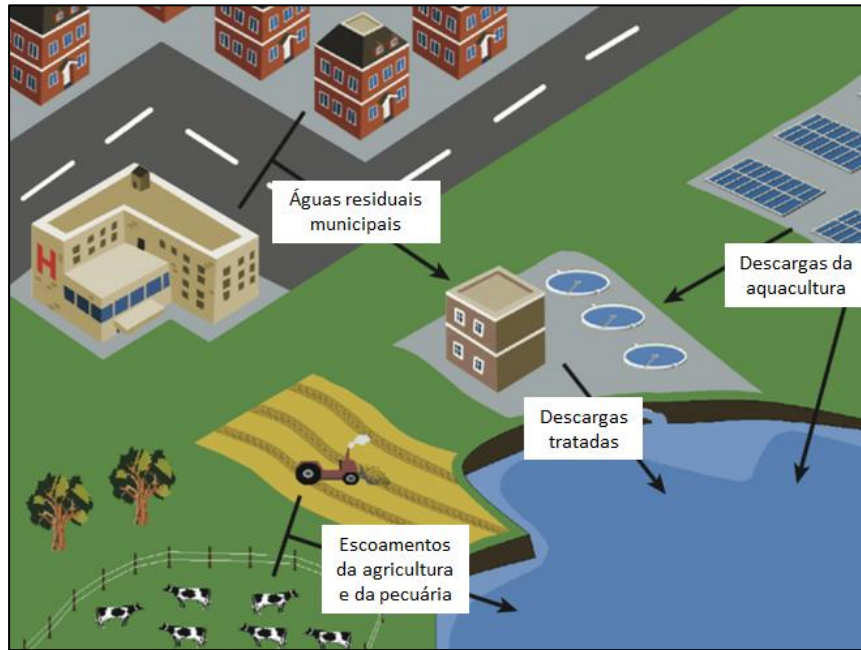


Figura 4 | Atividades antropogênicas que resultam na libertação de antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência para os ambientes hídricos (Adaptado de Marti et al., 2014).

De uma forma geral, os antibióticos não são facilmente biodegradáveis no meio hídrico (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008). Adicionalmente, estes compostos podem ligar-se a sedimentos em suspensão, o que contribui ainda mais para a sua reduzida taxa de biodegradação e, conseqüentemente, para o seu elevado tempo de permanência nestes locais (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Martinez, 2009).

A contaminação dos ambientes hídricos por antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência vai gerar uma forte pressão selectiva sobre os ecossistemas bacterianos naturais e levar à disseminação de estirpes naturalmente resistentes e à transferência horizontal de genes que conferem resistência para estirpes, até então, sensíveis (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Martinez, 2009; Dodd, 2012; Marti et al., 2014). Este fenómeno tem impactos a vários níveis, sendo o mais importante e o mais preocupante a transmissão de genes de resistência a antibióticos para bactérias patogênicas (Kim e Aga, 2007; Baquero et al., 2008; Martinez, 2009; Mojica e Aga, 2011; Marti et al., 2014).

Por outro lado, e apesar de nem todas as bactérias que adquirem resistência serem patogênicas para o Homem e para os animais, estas passam a fazer parte de um reservatório de genes de resistência com potencial de dispersão para bactérias patogênicas, também conhecido como o resistoma hídrico (Baquero et al., 2008).

1.5. Distribuição geográfica dos genes de resistência a antibióticos em ambientes hídricos

A emergência de genes de resistência a antibióticos em ambientes hídricos está a tornar-se numa preocupação a nível global, uma vez que estes genes têm vindo a ser cada vez mais frequentemente detectados em micro-organismos presentes não só em águas residuais e ETARs, como também em muitos reservatórios de águas superficiais e subterrâneas e, em alguns casos, até mesmo em águas para consumo humano e animal (Kümmerer, 2004; Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2009; Martinez, 2009; Zhang et al., 2009; Mojica e Aga, 2011; Almeida et al., 2014; Marti et al., 2014).

A sua distribuição geográfica tem vindo a ser descrita com base em estudos de detecção, tipagem e caracterização realizados por todo o mundo, com recurso a várias técnicas, entre as quais se destacam as de *polymerase chain reaction (PCR) simplex, multiplex* e quantitativo em tempo real, sequenciação de ADN e hibridação de ADN (Zhang et al., 2009).

No caso da Europa, tem vindo a ser frequente a detecção de genes de resistência a praticamente todos as classes de antibióticos em ambientes hídricos de países como a Alemanha, a Bélgica, a Dinamarca, a Grécia e Portugal (**Figura 5**) (Zhang et al., 2009).



Figura 5 | Distribuição geográfica de alguns genes de resistência a antibióticos nos ambientes hídricos europeus. Legenda: + - β -lactâmicos; ■ - Aminoglicosídeos; ○ - Tetraciclina; ▲ - Macrólidos; ▼ - Cloranfenicol; ★ - Trimetoprim (Adaptado de Zhang et al., 2009).

Os estudos já realizados em Portugal têm vindo a mostrar uma grande prevalência de genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos (Antunes et al., 2006; Moura et al., 2007; Almeida et al., 2014), aminoglicosídeos (da Silva et al., 2007; Moura et al., 2007), tetraciclina (Almeida et

al., 2014), macrólidos (Almeida et al., 2014), quinolonas (Almeida et al., 2014), sulfonamidas (Antunes et al., 2006; Almeida et al., 2014) e trimetoprim (um antibiótico pertencente à classe das diaminopiridinas) (Antunes et al., 2006; da Silva et al., 2007; Moura et al., 2007; Almeida et al., 2014) em vários ambientes hídricos do país (**Tabela 1**).

Tabela 1 | Antibióticos para os quais foram detectados genes de resistência em ambientes hídricos portugueses.

Classe de antibióticos	Ambientes hídricos	Referências Bibliográficas
β -lactâmicos	Efluentes urbanos e agropecuários	Antunes et al., 2006; Moura et al., 2007; Almeida et al., 2014
Aminoglicosídeos	Efluentes urbanos e agropecuários; águas superficiais	da Silva et al., 2007; Moura et al., 2007
Tetraciclina	Efluentes urbanos e agropecuários; descargas tratadas	Almeida et al., 2014
Macrólidos	Efluentes urbanos e agropecuários; descargas tratadas	Almeida et al., 2014
Quinolonas	Efluentes urbanos e agropecuários; descargas tratadas; águas superficiais	Almeida et al., 2014
Sulfonamidas	Efluentes urbanos e agropecuários; descargas tratadas; águas superficiais	Antunes et al., 2006; Almeida et al., 2014
Trimetoprim	Efluentes urbanos e agropecuários; descargas tratadas; águas superficiais; águas para consumo	Antunes et al., 2006; da Silva et al., 2007; Moura et al., 2007; Almeida et al., 2014

1.6. As cianobactérias

Com um registo fóssil que remonta a cerca de 3,5 biliões de anos atrás, as cianobactérias representam um dos grupos de organismos mais bem-sucedidos do planeta (Mur et al., 1999; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011).

Inicialmente, estes organismos começaram por ser classificados como algas azuis-esverdeadas devido a algumas das suas características particulares: a semelhança com as algas, o facto de possuírem clorofila em vez de bacterioclorofila e o facto de produzirem oxigénio através de um processo de fotossíntese oxigénica composto por dois fotossistemas (fotossistemas I e II), à semelhança do que acontece com as algas e com as plantas superiores (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011). Contudo, estudos realizados posteriormente mostraram que, apesar de estas características as diferenciarem de outras bactérias, as cianobactérias são organismos procarióticos, uma vez que não possuem núcleos nem outros organelos celulares e possuem uma parede celular de peptidoglicano semelhante à de bactérias de Gram-negativo e ribossomas 70S, também característicos de organismos procarióticos (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Singh et al., 2011).

As cianobactérias encontram-se amplamente distribuídas em ecossistemas de água doce, marinhos e terrestres (Mur et al., 1999; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011). A sua presença é mais comum em lagos, lagoas, nascentes, pântanos, riachos e rios, onde desempenham funções importantes ao nível da dinâmica de elementos como o azoto, o carbono e o oxigénio (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011). No entanto, podem também ser encontradas em ambientes marinhos e em vários *habitats* extremos, tais como lagos hipersalinos, fontes geotermais, ambientes gelados e desertos áridos (Jungblut et al., 2005; Kulasooriya, 2011; Moreira et al., 2013).

Estes organismos podem apresentar uma forma cocóide ou filamentosa e existir sob a forma unicelular ou colonial (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011). Em relação às formas cocóides, os géneros mais frequentes são *Agmenellum*, *Anacystis*, *Gloeocapsa*, *Microcystis* e *Synechococcus* (**Figura 6**) (Kulasooriya, 2011). Por outro lado, os géneros mais frequentes de formas filamentosas são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Gleotrichia*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Rivularia* e *Spirulina* (**Figuras 7 e 8**) (Kulasooriya, 2011).

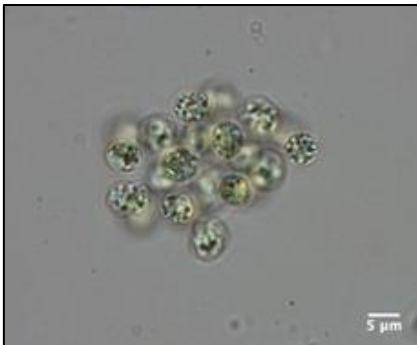


Figura 6 | Colónias de *Microcystis aeruginosa*
(Fotografia de Catarina Churro).



Figura 7 | Colónias de *Planktothrix agardhii*
(Fotografia de Catarina Churro).



Figura 8 | Colónias de *Planktothrix mougeotii*
(Fotografia de Catarina Churro).

Em alguns géneros filamentosos, ocorre a diferenciação de células vegetativas para tipos celulares que desempenham papéis específicos ao nível fisiológico, reprodutivo e ecológico (Vincent, 2009). Dois dos exemplos mais representativos são: os heterocistos, que são células de paredes espessas onde se localiza o enzima nitrogenase, utilizado na fixação de azoto (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011); os acinetos, que são células estruturalmente reorganizadas e formadas em condições desfavoráveis, que permitem a sobrevivência das cianobactérias (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011; Singh et al., 2011).

Existem dois grandes grupos de cianobactérias nos meios hídricos: as espécies bentónicas formadoras de tapetes celulares e as espécies planctónicas formadoras de florescências (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011).

As espécies bentónicas formadoras de tapetes celulares crescem aderidas a superfícies submersas de águas que permitem a penetração da luz solar até esses locais, formando crostas e biofilmes sobre rochas, plantas, areias, sedimentos e outros substratos (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011). A espessura dos biofilmes pode variar entre um ou dois milímetros até dezenas de centímetros (Vincent, 2009). Estas espécies são abundantes em zonas húmidas, como pântanos e charcos, embora também possam ser observadas em lagos, lagoas e riachos do Ártico e do Antártico, bem como em lagos hipersalinos e fontes geotermiais (Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011).

As espécies planctónicas formadoras de florescências tendem a proliferar em águas quentes, estáveis e ricas em nutrientes, estando ausentes de regiões polares e alpinas (Mur et al., 1999; Vincent, 2009). A maioria destas espécies possui vesículas de gás que se preenchem com gases provenientes do meio circundante e que permitem que células e colónias consigam regular a sua flutuabilidade e ajustar a sua posição vertical na coluna de água (Mur et al., 1999; Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011). Assim, em condições específicas, tais como elevados níveis de eutrofização e de pH, baixas concentrações de CO₂ e temperaturas superiores a 15°C, a flutuabilidade destas espécies pode levar ao aparecimento de florescências à superfície (**Figuras 9a e 9b**).



Figuras 9a e 9b | Florescência de cianobactérias nas águas da albufeira de Magos (Fotografias de Catarina Churro).

As florescências cianobacterianas causam graves problemas em termos de qualidade da água, uma vez que estes organismos produzem uma grande variedade de compostos que modificam o seu sabor e odor (Vincent, 2009). Contudo, a maior preocupação relacionada com a ocorrência de florescências prende-se com a produção de três grandes classes de toxinas: as hepatotoxinas, as neurotoxinas e as dermatotoxinas, que têm estado implicadas na morte de animais e em efeitos na saúde humana (Chorus et al., 2000; van Apeldoorn et al. 2007; Svirčev et al., 2009; Vincent, 2009). A presença de espécies tóxicas de cianobactérias em reservatórios de água para consumo e para fins recreativos representa uma grande preocupação, uma vez que estas toxinas são solúveis e persistentes em água, não sendo, muitas vezes, eliminadas eficazmente pelos sistemas de tratamento de águas convencionais (Vincent, 2009; Kulasoorya, 2011).

Para além das toxinas, as cianobactérias produzem também outros compostos bioactivos. Entre eles, destacam-se os compostos antitumorais, imunomoduladores, citotóxicos, antivirais, antifúngicos e antibacterianos (Martins et al., 2008; Singh et al., 2010; Kulasoorya, 2011; Dias et al., 2015), que podem desempenhar um papel importante nos seus ambientes naturais e que apresentam um potencial farmacêutico ainda por explorar.

Todas as características descritas anteriormente demonstram a grande versatilidade fisiológica e a grande capacidade de adaptação das cianobactérias às mais variadas condições ambientais. Assim, é razoável pensar-se que, de alguma forma, estes organismos sejam também capazes de se adaptar à presença cada vez mais frequente de antibióticos nos seus *habitats* naturais.

1.7. Objectivos

Nos seus *habitats* naturais, as cianobactérias estão frequentemente expostas a antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência. Contudo, desconhece-se se adquirem genes de resistência a partir destes micro-organismos e / ou se os transferem para outros. Ou seja, o papel das cianobactérias na emergência e disseminação de genes de resistência a antibióticos está ainda por esclarecer, constituindo uma área de investigação inovadora.

A análise do fenótipo e do genótipo de susceptibilidade das cianobactérias a antibióticos permitirá avaliar o seu potencial envolvimento no resistoma hídrico e o conhecimento acerca da sua resistência a antibióticos poderá contribuir para prevenir a disseminação de genes de resistência para agentes patogénicos.

Assim, os principais objectivos deste trabalho são:

1. Avaliar o fenótipo de susceptibilidade a antibióticos de cianobactérias isoladas de diferentes albufeiras e de uma ETAR;
2. Pesquisar a presença de genes e de unidades genéticas móveis associadas à resistência a antibióticos nessas cianobactérias;
3. Avaliar a relação entre os fenótipos e os genótipos de resistência das cianobactérias;
4. Avaliar a relação entre a susceptibilidade / resistência das cianobactérias aos antibióticos com a espécie / género cianobacteriano e o seu local de colheita.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cianobactérias estudadas

2.1.1. Espécies e estirpes cianobacterianas

Foram estudadas oito estirpes de *Microcystis aeruginosa* e oito estirpes de *Planktothrix agardhii* pertencentes à colecção de culturas *Estela Sousa e Silva Algal Culture Collection* (ESSACC) (Paulino et al., 2009) do Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia (ASBE) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSARJ) e oito estirpes de *Planktothrix mougeotii* pertencentes à colecção de culturas do Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE) do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR.UP).

As estirpes de *M. aeruginosa* (**Tabela 2**) e de *P. agardhii* (**Tabela 3**) foram previamente isoladas de água doce superficial de diferentes albufeiras portuguesas. Por seu turno, as estirpes de *P. mougeotii* – LEGE 06224, LEGE 06225, LEGE 06226, LEGE 06233, LEGE 07227, LEGE 07229, LEGE 07230 e LEGE 07231 – foram previamente isoladas da ETAR de Febros, localizada em Vila Nova de Gaia e dimensionada para uma população de cerca de 80.000 habitantes (Martins et al., 2010).

Todas as cianobactérias em estudo foram previamente identificadas de acordo com as suas características morfométricas, descritas por Komárek e Anagnostidis (1998, 2005), e pela sequenciação do gene 16S rARN (Valério et al., 2009; Martins et al., 2010).

Tabela 2 | Estirpes de *M. aeruginosa* estudadas e caracterização das respectivas albufeiras de origem.

<i>M. aeruginosa</i>			
Estirpe cianobacteriana	Albufeira de origem	Concelho	Principal utilização
LMECYA 50	Roxo	Aljustrel	Irrigação / Abastecimento de cerca de 44.000 habitantes
LMECYA 91B	Montargil	Ponte de Sôr	Irrigação / Energia / Fins recreativos
LMECYA 108	Caia	Elvas	Irrigação / Abastecimento de cerca de 38.500 habitantes
LMECYA 113	Montargil	Ponte de Sôr	Irrigação / Energia / Fins recreativos
LMECYA 142	Montargil	Ponte de Sôr	Irrigação / Energia / Fins recreativos
LMECYA 151	Monte da Barca	Coruche	Irrigação / Fins recreativos
LMECYA 159	Magos	Salvaterra de Magos	Irrigação
LMECYA 167	Corgas	Proença-a-Nova	Abastecimento de cerca de 8.000 habitantes

Tabela 3 | Estirpes de *P. agardhii* estudadas e caracterização das respectivas albufeiras de origem.

<i>P. agardhii</i>			
Estirpe cianobacteriana	Albufeira de origem	Concelho	Principal utilização
LMECYA 153A	Enxoé	Serpa	Abastecimento de cerca de 22.000 habitantes
LMECYA 230	São Domingos	Peniche	Irrigação / Abastecimento de cerca de 27.000 habitantes
LMECYA 257	São Domingos	Peniche	Irrigação / Abastecimento de cerca de 27.000 habitantes
LMECYA 269	Magos	Salvaterra de Magos	Irrigação
LMECYA 280	São Domingos	Peniche	Irrigação / Abastecimento de cerca de 27.000 habitantes
LMECYA 283	Patudos	Alpiarça	Fins recreativos
LMECYA 292	São Domingos	Peniche	Irrigação / Abastecimento de cerca de 27.000 habitantes
LMECYA 303	São Domingos	Peniche	Irrigação / Abastecimento de cerca de 27.000 habitantes

2.1.2. Manutenção das culturas cianobacterianas

As estirpes cianobacterianas em estudo (**Figuras 10, 11 e 12**) foram mantidas em meio Z8 (**Anexo I**) (Skulberg e Skulberg, 1990), no interior de erlenmeyers de 100 mL com tampa roscada (*Duran*®), numa câmara de culturas, onde foram expostas a ciclos de 14 horas de luz – com uma intensidade de, aproximadamente, $16 \pm 4 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ – e 10 horas de escuro, a uma temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. As culturas (não axénicas) foram repicadas com uma periodicidade mensal e todos os procedimentos inerentes à sua manipulação foram realizados em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar (*Hera Safe*).



Figura 10 | Culturas de *M. aeruginosa* estudadas
(Fotografia de Micaela Oliveira).

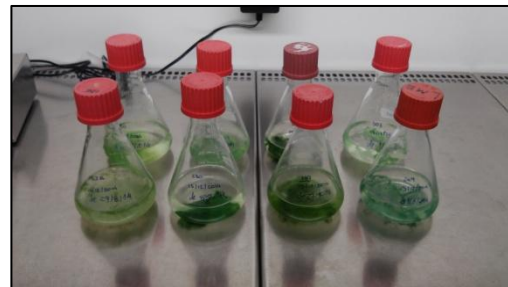


Figura 11 | Culturas de *P. agardhii* estudadas
(Fotografia de Micaela Oliveira).

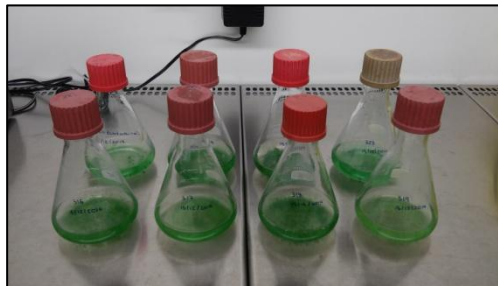


Figura 12 | Culturas de *P. mougeotii* estudadas
(Fotografia de Micaela Oliveira).

2.2. Antibióticos testados

Foram testados nove antibióticos pertencentes a diferentes classes: β -lactâmicos (amoxicilina, ceftazidima e ceftriaxona), aminoglicosídeos (canamicina e gentamicina), tetraciclina (tetraciclina), quinolonas (ácido nalidíxico e norfloxacina) e diaminopiridinas (trimetoprim) (**Tabela 4**). Estes antibióticos foram escolhidos pelo facto de serem dos mais frequentemente utilizados no tratamento de doenças infecciosas em medicina humana e veterinária (Almeida et al., 2014) e, conseqüentemente, dos mais frequentemente detectados em vários ambientes hídricos do país (Antunes et al., 2006; da Silva et al., 2007; Moura et al., 2007; Almeida et al., 2014).

Tabela 4 | Características dos antibióticos testados.

Classe	Nome do antibiótico	Marca	Potência (% p/p)	Solubilidade em H ₂ O
β-lactâmicos	Trihidrato de amoxicilina (AMX)	<i>ATRAL</i>	85,6	4 mg/mL
	Pentahidrato de ceftazidima (CAZ)	<i>GSK</i>	84,6	348 mg/L
	Ceftriaxona sódica (CRO)	<i>Roche</i>	99,8	400 mg/mL
Aminoglicosídeos	Sulfato de canamicina (KAN)	<i>Sigma</i>	75	50 mg/mL
	Sulfato de gentamicina (GEN)	<i>ATRAL</i>	66,4	50 mg/mL
Tetraciclinas	Cloridrato de tetraciclina (TET)	<i>Cipan</i>	96,3	10 mg/mL
Quinolonas	Ácido nalidíxico (NAL)	<i>Sigma</i>	100	100 mg/mL
	Norfloxacina (NOR)	<i>Mepha</i>	99,8	0,28 mg/mL
Diaminopiridinas	Trimetoprim (TMP)	<i>Roche</i>	99,9	400 mg/L

2.3. Avaliação do fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos

2.3.1. Preparação dos antibióticos

As soluções *stock* dos antibióticos foram preparadas através da dissolução dos antibióticos em pó em água bidestilada estéril (ddH₂O estéril) (*B/Braun*), após pesagem em balança analítica de precisão (*Mettler AE200*) (**Tabela 5**), e armazenadas a -20°C. Dependendo da solubilidade de cada antibiótico (**Tabela 4**), estas soluções encontram-se entre 25x a 100x mais concentradas do que as soluções de trabalho (**Tabela 5**).

As soluções de trabalho dos antibióticos foram preparadas através da diluição das soluções *stock* em ddH₂O estéril (*B/Braun*) para uma concentração final de 6,4 mg/L (**Tabela 5**), e armazenadas a -20°C.

Tabela 5 | Preparação das soluções *stock* e de trabalho dos antibióticos testados.

Antibiótico	Solução <i>stock</i>			Solução de trabalho	
	Quantidade de antibiótico pesada (mg)	Volume de ddH ₂ O (mL)	[Antibiótico] (mg/L)	Diluição	[Antibiótico] (mg/L)
Trihidrato de amoxicilina (AMX)	18,7	25	640	1:100	6,4
Pentahidrato de ceftazidima (CAZ)	18,9	50	320	1:50	6,4
Ceftriaxona sódica (CRO)	16	25	640	1:100	6,4
Sulfato de canamicina (KAN)	21,3	25	640	1:100	6,4
Sulfato de gentamicina (GEN)	24,1	25	640	1:100	6,4
Cloridrato de tetraciclina (TET)	16,6	25	640	1:100	6,4
Ácido nalidíxico (NAL)	16	25	640	1:100	6,4
Norfloxacina (NOR)	16	100	160	1:25	6,4
Trimetoprim (TMP)	16	50	320	1:50	6,4

2.3.2. Preparação dos inóculos cianobacterianos

Para preparar os inóculos cianobacterianos, foi necessário determinar as concentrações celulares (número de células/mL) das culturas *stock* de cada uma das estirpes. Para tal, procedeu-se à diluição de cada cultura *stock* (diluições entre 1:10 e 1:300, consoante a densidade da cultura) em ddH₂O e à sua fixação com uma solução de lugol. De seguida, 1 mL de cada cultura já diluída e fixada foi colocado numa câmara de contagem de *Sedgewick-Rafter* (*Graticules – Pyser SGI*) e deixado em repouso durante 20 a 30 minutos para sedimentação. Procedeu-se, posteriormente, à sua quantificação celular em dez quadrículas da câmara de contagem (cada quadrícula corresponde a um volume de 1 µL) escolhidas aleatoriamente (LeGresley e McDermott, 2010). O processo de contagem do número de células em colónias clatradas (caso da espécie *M. aeruginosa*) difere do processo de contagem para colónias filamentosas (caso das espécies *Planktothrix* spp.), como a seguir se explica.

No caso das estirpes de *M. aeruginosa*, o número de células presentes nas dez quadrículas escolhidas foi obtido directamente por contagem ao microscópio óptico (*Olympus CK40*, ampliação 100x), tendo a concentração celular das culturas *stock* sido posteriormente determinada através da equação:

$$C_{(c\acute{e}ls/mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ de } c\acute{e}ls \text{ em } 10 \text{ quad.} * 1000 \mu L}{10 \mu L} * \text{factor de dilui\c{c}\~{a}o}$$

No caso das estirpes de *P. agardhii* e de *P. mougeotii*, procedeu-se à medição do comprimento dos filamentos presentes nessas quadrículas (*Olympus CK40*, ampliação 100x) e à determinação do comprimento médio das células da estirpe em questão (*Olympus B2002*, ampliação 1000x), utilizando-se, para tal, as escalas micrométricas das oculares dos microscópios. A concentração celular das culturas *stock* foi posteriormente determinada através das equações:

$$Comp. \text{ total dos filamentos}_{\mu m} = Comp. \text{ dos filamentos em } 10 \text{ quad. } (\mu m) * \text{factor de ampliação}$$

$$N^{\circ} \text{ c\acute{e}ls em } 10 \text{ quad.} = \frac{Comp. \text{ total dos filamentos } (\mu m)}{Comp. \text{ m\acute{e}dio das c\acute{e}ls } (\mu m)}$$

$$C_{(c\acute{e}ls/mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ de } c\acute{e}ls \text{ em } 10 \text{ quad.} * 1000 \mu L}{10 \mu L} * \text{factor de dilui\c{c}\~{a}o}$$

Uma vez determinadas as concentrações celulares das culturas *stock* de cada uma das estirpes, procedeu-se à diluição das mesmas em meio Z8, de forma a que os inóculos cianobacterianos utilizados apresentassem uma concentração final de 1×10^6 células/mL, sendo esta uma densidade celular frequentemente observada em florescências cianobacterianas (Figueiredo et al., 2006; Galvão et al., 2008; Bellém et al., 2013; Churro et al., 2013).

2.3.3. Exposição das cianobactérias aos antibióticos

Para avaliar o fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos, foi utilizado um procedimento baseado no método *standard* da microdiluição (*Broth Microdilution*) para bactérias (ISO, 2006; EUCAST, 2014), mas adaptado às condições de cultura específicas das cianobactérias.

Para cada uma das espécies em estudo – *M. aeruginosa*, *P. agardhii* e *P. mougeotii* – foram preparadas nove microplacas de 96 poços (*Nunc*) (uma para cada antibiótico testado), contendo 100 μ L de meio Z8 em cada poço (Figura 13).

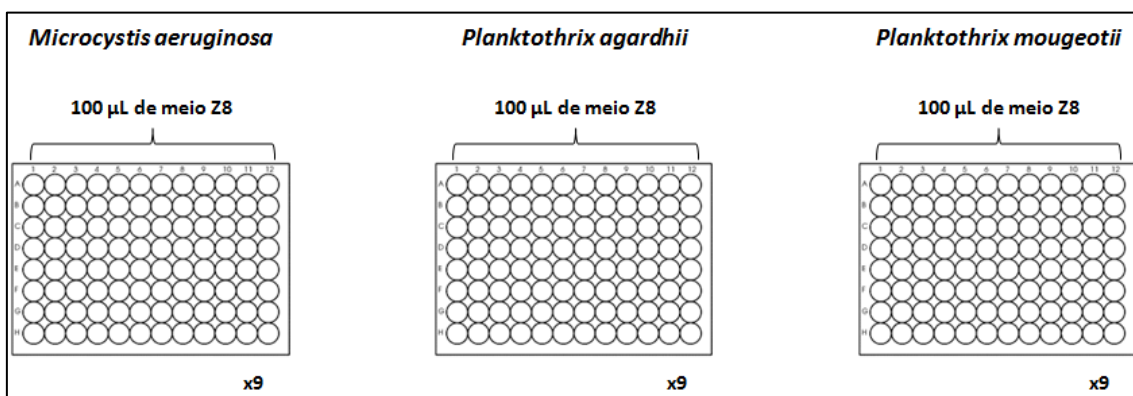


Figura 13 | Primeiro passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos – Para cada uma das espécies, foram preparadas nove microplacas de 96 poços contendo 100 μ L de meio Z8 em cada poço.

De seguida, foram adicionados 100 μ L de solução de trabalho de cada um dos antibióticos (6,4 mg/L) aos poços da coluna 12 das microplacas correspondentes, procedendo-se à sua diluição sucessiva (1:2) até aos poços da coluna 2 (Figura 14). Aos poços da coluna 1 não foi adicionada solução de antibiótico, visto corresponderem ao controlo positivo do ensaio. (Figura 14).

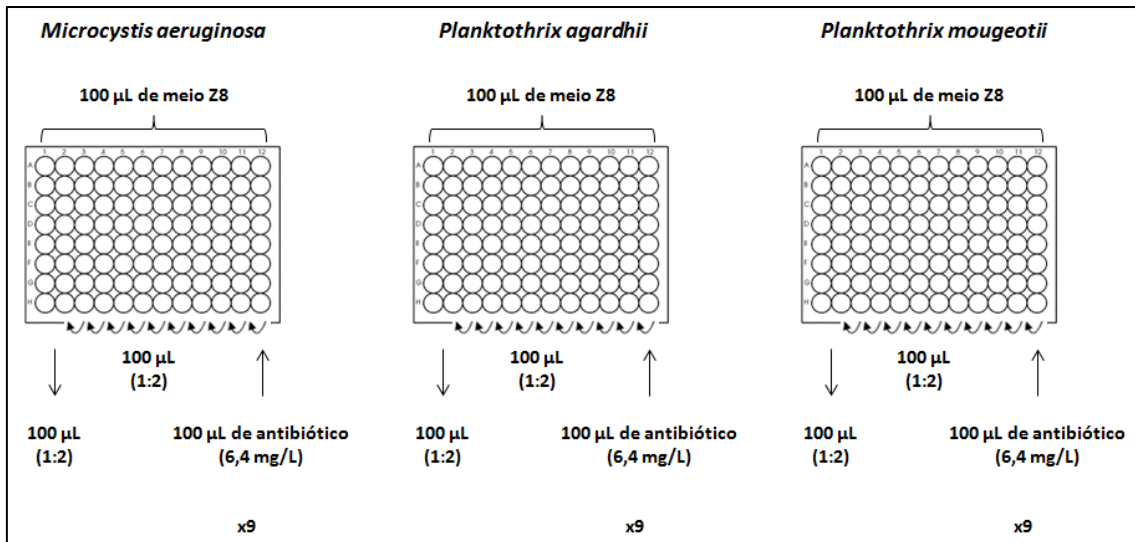


Figura 14 | Segundo passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos – Foram adicionados 100 µL de solução de trabalho de cada um dos antibióticos aos poços da coluna 12 das microplacas correspondentes, procedendo-se à sua diluição sucessiva (1:2) até aos poços da coluna 2.

Por fim, a cada microplaca, foram adicionados 100 µL de inóculo de cada uma das estirpes em estudo, de acordo com o esquema indicado na Figura 15.

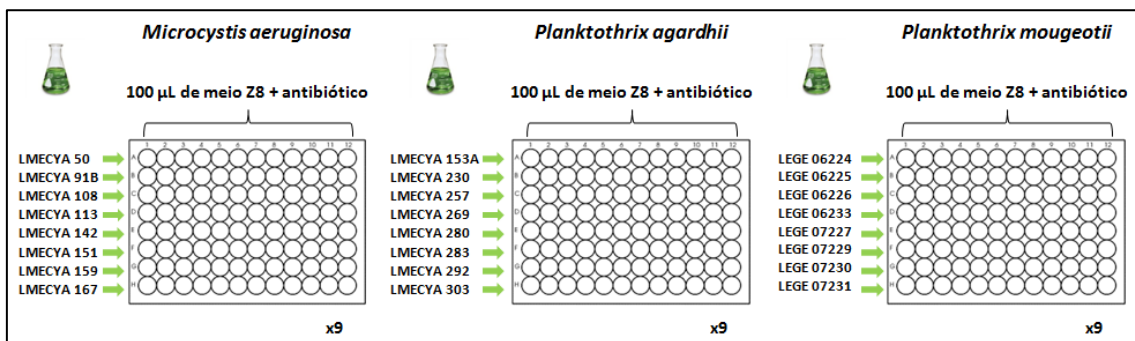


Figura 15 | Terceiro passo da exposição das cianobactérias aos antibióticos – A cada microplaca, foram adicionados 100 µL de inóculo de cada uma das estirpes em estudo.

O intervalo de concentrações de antibióticos ao qual as cianobactérias em estudo foram expostas variou entre 0,0015 mg/L (nos poços da coluna 2 de cada microplaca) e 1,6 mg/L (nos poços da coluna 12 de cada microplaca) (Figura 16), uma vez que a solução de trabalho (6,4 mg/L) sofreu duas diluições 1:2 ao longo dos passos descritos anteriormente: a primeira, ao ser adicionada aos poços da coluna 12 de cada microplaca (que já continham 100 µL de meio Z8) e a segunda, aquando da adição dos inóculos cianobacterianos.

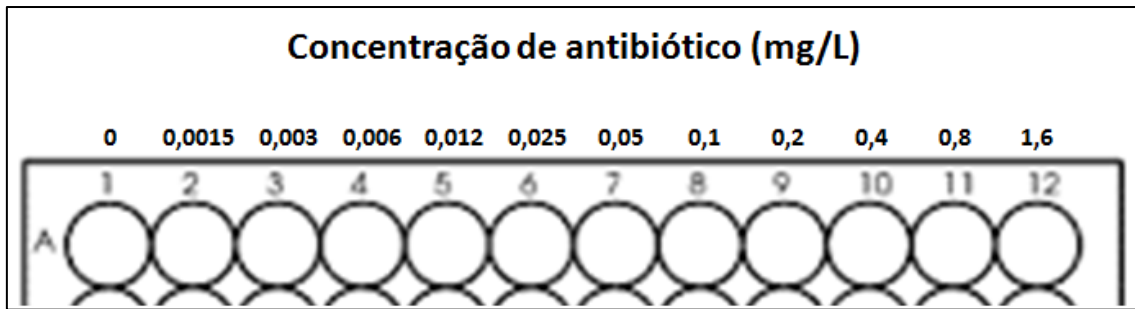


Figura 16 | Intervalo de concentrações de antibióticos ao qual cianobactérias em estudo foram expostas.

A escolha deste intervalo de concentrações baseou-se no facto de que, apesar de as concentrações de antibióticos no meio hídrico ainda não se encontrarem bem documentadas, os dados já disponíveis mostrarem que os seus valores podem variar entre a gama de ng/L e de mg/L em vários ambientes hídricos portugueses (Almeida et al., 2014). Adicionalmente, os poucos estudos já realizados acerca do impacto dos antibióticos nas cianobactérias reportam concentrações na gama de mg/L (van der Grinten et al., 2010; González-Pleiter et al., 2013; Kolar et al., 2014). Assim, as diluições sucessivas a que as cianobactérias foram expostas englobam concentrações desde µg/L a mg/L, testando-se, desta forma, o pior cenário de contaminação das águas por antibióticos.

2.3.4. Análise do crescimento cianobacteriano e determinação das concentrações inibitórias mínimas

As microplacas contendo as culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos foram incubadas na câmara de culturas, nas condições já descritas no ponto 2.1.2 e, durante 14 dias após a incubação, procedeu-se à observação macroscópica e microscópica (*Olympus CK40*) da integridade das culturas, bem como à medição das suas densidades ópticas a 450 nm (DO_{450nm}) no espectrofotómetro (*Multiskan Ascent, Thermo Labsystems*) (Churro et al., 2009).

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a concentração mais baixa de antibiótico que inibe totalmente o crescimento celular (EUCAST, 2003). Neste caso, considerou-se que o crescimento celular foi inibido quando:

1. Após observação macroscópica (a “olho nu”) das culturas, não se observou coloração verde nos poços das microplacas;
2. Após observação microscópica das culturas, não se observaram colónias cianobacterianas nos poços das microplacas;

3. A DO_{450nm} das culturas expostas foi significativamente negligenciável em relação aos poços de controlo.

No decorrer deste trabalho, foi frequente a observação microscópica de algumas colónias em poços que se considerava corresponderem a putativas CIMs, uma vez que esses poços não apresentaram um crescimento visível a “olho nu” e exibiram uma DO_{450nm} muito baixa. Consequentemente, foi necessário verificar se essas colónias eram ou não viáveis, de forma a confirmar o valor da CIM. Assim, 20 μ L do conteúdo dos poços que suscitaram dúvidas foram re-inoculados em novas microplacas (*Nunc*) contendo 180 μ L de meio Z8 fresco, e o crescimento celular foi seguido por mais 14 dias. O valor da CIM manteve-se quando não foi observado crescimento celular para a concentração de antibiótico em causa. Quando ainda foi observado crescimento celular, a CIM correspondeu à concentração de antibiótico imediatamente seguinte.

À excepção da preparação dos antibióticos (ponto 2.3.1), todos os procedimentos inerentes à avaliação do fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos foram realizados em três experiências independentes.

2.3.5. Controlo da qualidade dos antibióticos

De forma a avaliar se a potência dos antibióticos se mantinha durante o tempo de estudo e nas condições de incubação das culturas, foi realizado um teste de estabilidade da sua actividade em estirpes padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Estas estirpes são frequentemente utilizadas como controlos de qualidade em testes de susceptibilidade de bactérias a antibióticos (ISO, 2006; CLSI, 2014; EUCAST, 2014). As CIMs *standard* dos antibióticos testados para estas estirpes padrão encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6 | CIMs *standard* (mg/L) dos antibióticos testados para as estirpes padrão de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213) (ISO, 2006; WHO, 2010; CLSI, 2014).

Antibiótico	CIM (mg/L)	
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)
Amoxicilina ^a	2 – 8	0,5 – 2
Ceftazidima	0,06 – 0,5	4 – 16
Ceftriaxona	0,03 – 0,12	1 – 8
Canamicina	1 – 4	1 – 4
Gentamicina	0,25 – 1	0,12 – 1
Tetraciclina	0,5 – 2	0,12 – 1
Ácido nalidíxico	1 – 4	16 – 64
Norfloxacina	0,03 – 0,12	0,5 – 2
Trimetoprim	0,5 – 2	1 – 4

^a As CIMs *standard* deste antibiótico são inferidas a partir das da ampicilina.

O teste consistiu na incubação dos antibióticos em meio Z8, nas condições de cultura das cianobactérias, e na determinação das respectivas CIMs nas estirpes bacterianas de referência, após períodos de incubação dos antibióticos entre 0 e 14 dias, de acordo com o método *standard Broth Microdilution* (ISO, 2006; EUCAST, 2014), como se descreve seguidamente.

Foram preparadas e colocadas na câmara de culturas, nas condições já descritas no ponto 2.1.2, microplacas de 96 poços (*Nunc*) contendo diluições sucessivas (1:2) das soluções *stock* dos antibióticos em meio Z8, de forma a corresponderem a soluções 10x concentradas relativamente ao intervalo de CIMs apresentado para os dois controlos ATCC.

Para a preparação dos inóculos bacterianos, descongelaram-se ambas as estirpes ATCC para placas de gelose-sangue, onde permaneceram a 37°C, durante 24 horas. No dia seguinte, as culturas foram repicadas para placas de gelose simples e novamente incubadas a 37°C, durante 24 horas. No dia da exposição, repicaram-se as colónias para tubos com meio líquido Mueller-Hinton e procedeu-se à leitura da DO desses tubos no densitómetro (*DEN-1B, McFarland Densitometer, Grant-Bio*). As colónias foram diluídas ou ressuspensas até o valor da turvação corresponder a 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/mL). Uma vez atingida esta concentração, as soluções foram diluídas 20x, para uma concentração final de 5×10^6 UFC/mL.

Para cada tempo de incubação dos antibióticos em meio Z8 (0, 1, 7 e 14 dias), procedeu-se à amostragem de 10 µL de antibiótico para microplacas de fundo cónico (*Nunc*) contendo 10 µL dos inóculos ATCC (5×10^6 UFC/mL) e 90 µL de meio Mueller-Hinton (**Figura 17**). Estas microplacas foram incubadas a 37°C, durante 18 ± 2 horas, e os resultados foram interpretados de acordo com os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (ISO, 2006; EUCAST, 2014).

O controlo da viabilidade das estirpes ATCC consistiu em 10 µL de meio Z8, 10 µL de inóculo ATCC e 90 µL de meio Muller-Hinton.

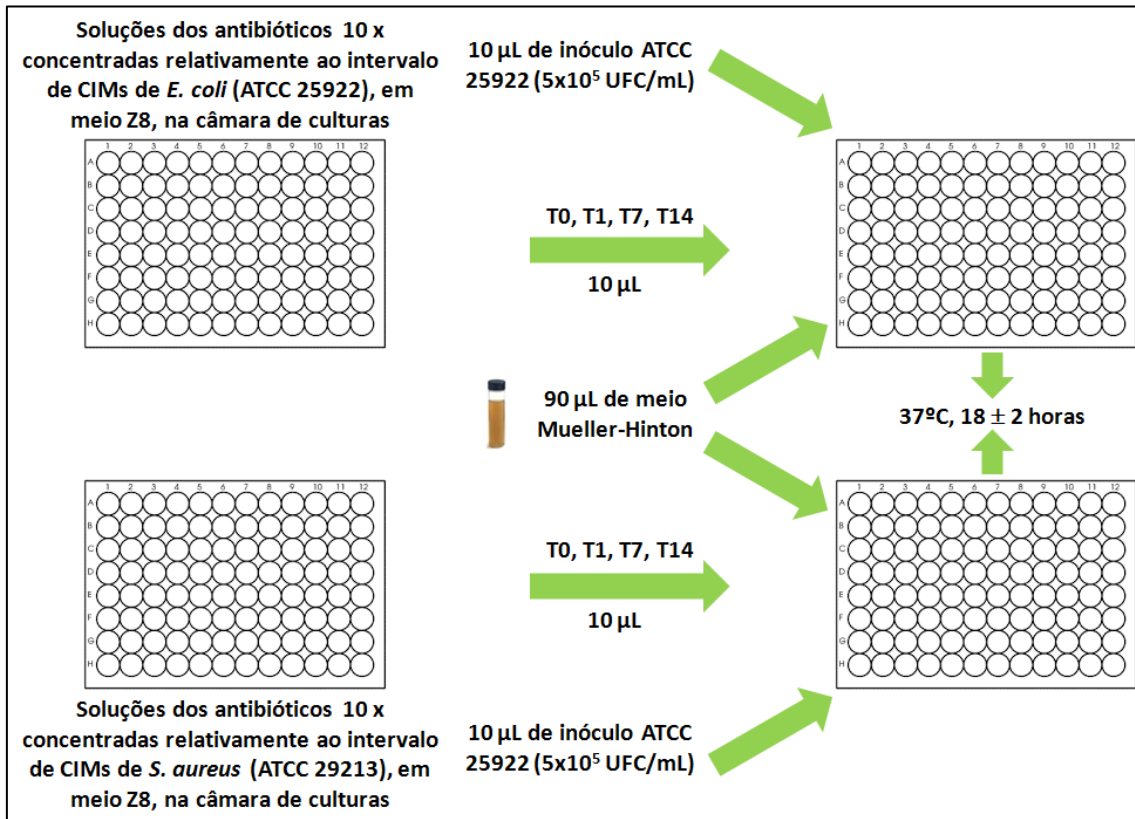


Figura 17 | Representação esquemática do teste de controlo da qualidade dos antibióticos.

2.4. Pesquisa de genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo

2.4.1. Extracção e quantificação do ADN cianobacteriano

A pesquisa de genes de resistência a antibióticos envolveu a extracção prévia do ADN das culturas cianobacterianas utilizando o *kit* Invisorb® *Spin Plant Mini Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* envolveu a lise celular do material, seguida da imobilização do ADN genómico numa membrana e da sua posterior lavagem e eluição.

Após a extracção, as amostras foram quantificadas espectrofotometricamente (*NanoDrop 1000*, *Thermo Scientific*) e diluídas para uma concentração final de ADN entre 50 e 150 ng/µL.

2.4.2. Pesquisa de genes de resistência a antibióticos por PCR

Para pesquisar a presença de genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo, foram realizados vários procedimentos de PCR, representados na **Tabela 7**.

Tabela 7 | PCRs realizados para pesquisar a presença de genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo.

Tipo de PCR	Gene	Primer	Sequência 5'→3'	Fragmento amplificado (pb)
Multiplex	ampC	AmpCF AmpCR	CCC CGC TTA TAG AGC AAC AA TCA ATG GTC GAC TTC ACA CC	634 pb
	<i>bla</i> _{OXA}	OXAF OXAR	TAT CTA CAG CAG CGC CAG TG CGC ATC AAA TGC CAT AAG TG	199 pb
		<i>bla</i> _{SHV}	SHVF SHVR	TCA GCG AAA AAC ACC TTG TCC CGC AGA TAA ATC ACC
	<i>bla</i> _{TEM}		P1 P2	TAC GAT ACG GGA GGG CTT AC TTC CTG TTT TTG CTC ACC CA
Simplex		<i>strA-strB</i>	strA-F strB-R	TGG TGA ATC GCA TTC TGA CTG GTC TGT CGC ACC TGC TTG ATC
Multiplex	<i>tetA</i>	tetA-F tetA-R	GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT	957 pb
	<i>tetB</i>	tetB-F tetB-R	CTC AGT ATT CCA AGC CTT TG CTA AGC ACT TGT CTC CTG TT	436 pb
Multiplex	<i>aac</i>	acc6Ib-5 acc6Ib-6	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	482 pb
		<i>qepA</i>	qepA-F qepA-R	GAA CCG ATG ACG AAG CAC AG CGT CGT TAA AGC ATT CTT GTC C
	<i>qnrA</i>		qnrA qnrB	GGC TAT GGA TAT TAT TGA TAA AG CTA ATC CGG CAG CAC TAT TA
		<i>qnrB</i>	qnrBF-Tw qnrBR-Tw	CCT-GAG-CGG-CAC-TGA-ATT-TAT GTT TGC TGC TCG CCA GTC GA
	<i>qnrC</i>		qnrCF2 qnrCR	AAC GTA CGA TCA AAT TG TCC ACT TTA CGA GGT TCT
		<i>qnrD</i>	qnrDF qnrDR	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A AAC AAG CTG AAG CGC CTG
	<i>qnrS</i>		qnrSJF qnrSJR	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC
Simplex	<i>oqxAB</i>	oqxAF oqxBR	AGA GTT CAA AGC CAC GCT G CTC CTG CAT CGC CGT CAC CA	921 pb
Simplex	<i>dfrA1</i>	dfrA-Fwd dfrA-Rev	GTG AAA CTA TCA CTA ATG G TTA ACC CTT TTG CCA GAT TT	473 pb
Simplex	<i>dfrA17</i>	dfrA17-F dfrA17-R	TGA AAA TAT CAT TGA TTT CTG C TTA GCC TTT TTT CCA AAT CTG	474 pb
Simplex	<i>sul1</i>	sul1-F sul1-R	ATG GTG ACG GTG TTC GG CTA GGC ATG ATC TAA CCC TCG	840 pb
Simplex	<i>sul2</i>	sul2-F sul2-R	ATG AAT AAA TCG CTC ATC ATT TTC TTA ACG AAT TCT TGC GGT TTC	816 pb
Simplex	<i>sul3</i>	sul3-F sul3-R	ATG AGC AAG ATT TTT GGA ATC CTA ACC TAG GGC TTT GGA	791 pb
Simplex	<i>int1</i>	Int1-F Int1-R	TCT CGG GTA ACA TCA AGG AGG AGA TCG GAA GAC CTC	243 pb
Simplex	<i>int2</i>	Int2-F Int2-R	CTT ACC TGC ACT GGA TTA AG TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG	289 pb
Simplex	<i>int3</i>	Int3-F Int3-R	CTG AAG TCG AGG GTT TTC TG GCA AGT GGG TGG CGA ATG	687 pb
Simplex	<i>qacΔE</i>	qac-F qac-R	AAG TAA TCG CAA CAT CCG AAA GGC AGC AAT TAT GAG	254 pb
Simplex	<i>orf513</i>	orf513-F orf513-R	GCC AGG TCT TGA GTA TCG TC CAT GTA ATT GAG TCA GCG TAT C	363 pb

Todas as misturas de PCR perfizeram um volume final de 25 µL. As misturas pré-PCR foram preparadas numa câmara de fluxo laminar (*LaminAir, Holten*) e contiveram os seguintes constituintes: ddH₂O, tampão (10x, *Qiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (25 mM, *Qiagen*), Q Solution (5x, *Qiagen*), ADN Taq polimerase (5 unidades/µl, *Qiagen*) e *primers* específicos para amplificar o gene / genes em questão (**Tabela 7**), desenhados pela equipa do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS) do INSARJ. Fora da câmara de fluxo laminar, foram adicionados cerca de 100 ng de ADN a cada mistura, sendo posteriormente iniciado o programa de amplificação específico no termociclador (*C 1000™ Thermal Cycler, BioRad*).

Os programas de PCR utilizados apresentaram uma estrutura idêntica: uma fase inicial de desnaturação a 94°C / 95°C, um ciclo de desnaturação-hibridação-extensão repetido entre 25 a 30 vezes e uma etapa final de extensão a 72°C. As diferenças entre os programas residiram na duração das várias etapas e nas temperaturas de hibridação utilizadas, valores esses que foram obtidos pela optimização prévia dos PCRs no LNR-RA/IACS.

Depois de concluído cada PCR, foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 1,5% para averiguar a presença do gene / genes em estudo. Para preparar os géis, misturou-se 1,5 g de agarose (*Seakem® LE Agarose, Lonza*) com 100 mL de tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA), ferveu-se a mistura no micro-ondas e adicionaram-se 3 µL de sybr (*SYBR Safe, Life Technologies*) para marcar os ácidos nucleicos. Após a solidificação dos géis, foram aplicados 6 µL de cada produto de PCR, juntamente com 2 µL de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno-cianol e 30% glicerol), nos respectivos poços e as amostras foram sujeitas a electroforese em tampão TBE 1x, a 120V, durante 45 minutos. Na mesma corrida foram sempre incluídos controlos positivos (ADN de bactérias controlo) e negativos (mistura de PCR sem amostra de ADN). Por fim, os géis foram visualizados no transiluminador (*BioRad*), com recurso ao programa *Quantity One – 4.4.0 (BioRad)*. A identificação do gene / genes presentes nos produtos de PCR foi realizada por comparação do tamanho dos produtos (pb) com o tamanho dos respectivos controlos positivos e com o tamanho das bandas de um marcador de peso molecular.

2.4.3. Purificação dos produtos de PCR

Para purificar os produtos de PCR obtidos, foi utilizado um sistema de purificação que tem como base a actividade de dois enzimas hidrolíticos – uma fosfatase alcalina e uma

exonuclease – que actuam sobre os reagentes que não foram utilizados na reacção de PCR. A fosfatase alcalina elimina os dNTPs em excesso, enquanto a exonuclease remove *primers* residuais ou qualquer ADN de cadeia simples que tenha sido produzido.

Para a realização desta reacção de purificação, adicionaram-se 4µl de ExoProStar (*Illustra*) a 10µl de produto de PCR, sendo posteriormente iniciado o respectivo programa no termociclador (*C 1000™ Thermal Cycler, BioRad*). Este programa consistiu em duas fases principais: uma fase de incubação a 37°C, durante 15 minutos, que promoveu a actividade dos enzimas, e uma fase de 15 minutos, a 80°C, que teve como finalidade a inactivação dos mesmos.

De forma a estimar a presença de ADN nos produtos purificados, foi realizada uma electroforese em gel de agarose, conforme descrito no ponto 2.4.2., tendo a concentração de ADN sido estimada pela intensidade e nitidez das bandas obtidas.

2.4.4. Sequenciação dos produtos de PCR

Após a purificação, os produtos de PCR foram sequenciados com o objectivo de confirmar a presença dos genes em análise

Todas as misturas de sequenciação perfizeram um volume final de 10 µL. As misturas de pré-sequenciação foram preparadas numa câmara de fluxo laminar (*LaminAir, Holten*) e contiveram os seguintes constituintes: ddH₂O, Big Dye v1.1 (*Applied Biosystem*) e um dos *primers* específicos para o gene a sequenciar (**Tabela 7**). Fora da câmara de fluxo laminar, foram adicionados entre 1 µL e 3 µL do produto de PCR purificado (consoante a intensidade e nitidez da banda do produto em questão) a cada mistura, sendo posteriormente iniciado o programa de sequenciação no termociclador (*C 1000™ Thermal Cycler, BioRad*). Este programa consistiu num ciclo de três fases, repetido 29 vezes: uma fase inicial de desnaturação a 96°C, durante 10 segundos, uma fase de incubação a 56°C, durante 5 segundos e uma fase final de extensão a 60°C, durante 5 minutos.

Os produtos obtidos foram enviados à Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSARJ para remoção dos terminadores por precipitação alcoólica, migração no sequenciador automático (*ABI PRISM® 3100, Applied Biosystem*) e registo das sequências em electroferogramas que, posteriormente, foram analisados e interpretados com recurso ao programa *Bionumerics© (Applied Maths)*.

3. Resultados

3.1. Observação macroscópica e microscópica das culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos

A observação macroscópica das culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos revelou que as suas susceptibilidades dependem não só do tipo e da concentração de antibiótico testado, como também da espécie cianobacteriana em questão. As fotografias das microplacas contendo estas culturas encontram-se no **Anexo II** e, como é possível constatar pela sua observação, o efeito dos antibióticos no crescimento das cianobactérias seguiu, em regra, um de três padrões distintos: uma diminuição da viabilidade celular a baixas concentrações de antibiótico; uma diminuição da viabilidade celular a concentrações médias ou elevadas de antibiótico; pouca ou nenhuma diminuição da viabilidade celular a qualquer das concentrações de antibiótico testadas.

De uma forma geral, a observação microscópica das culturas cianobacterianas revelou-se concordante com a observação macroscópica. Ou seja, nos poços onde não foi observado crescimento visível a “olho nu”, também não se verificou a presença de colónias ao microscópio. No entanto, e como já foi referido no ponto 2.3.4., em alguns casos, foram observadas algumas colónias cianobacterianas em poços sem crescimento macroscópico aparente, o que levou à necessidade da realização de um teste para confirmar a sua inviabilidade.

3.2. Curvas dose-resposta

Os padrões de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos inferidos pela observação macroscópica e microscópica das culturas expostas foram confirmados pelas curvas dose-resposta de cada espécie para cada antibiótico testado (**Figuras 18 – 32**). As curvas dose-resposta foram obtidas através da representação gráfica da média dos valores da DO_{450nm} correspondentes aos três testes de susceptibilidade realizados com as oito estirpes de *M. aeruginosa*, *P. agardhii* e *P. mougeotii* (expressos como percentagem dos respectivos poços de controlo) em função das concentrações de antibiótico testadas.

3.2.1. Antibióticos β -lactâmicos

A espécie *M. aeruginosa* foi susceptível aos três antibióticos β -lactâmicos testados (especialmente à amoxicilina), tendo sido observada uma redução significativa da densidade

celular das culturas nas concentrações de 0,1 mg/L de amoxicilina, 0,4 mg/L de ceftazidima e 0,8 mg/L de ceftriaxona (Figura 18).

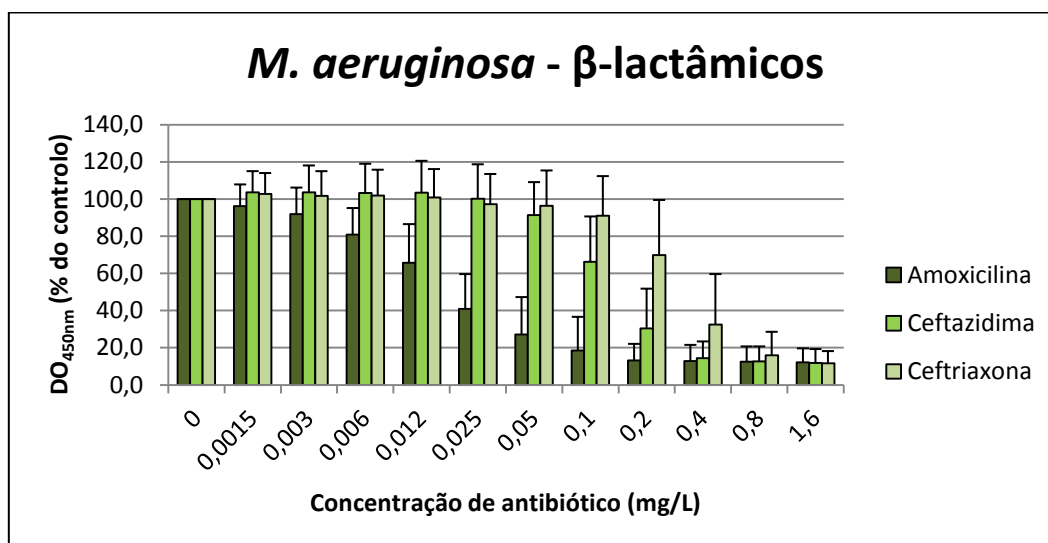


Figura 18 | Curvas dose-resposta de *M. aeruginosa* para os antibióticos β -lactâmicos.

A espécie *P. agardhii* foi igualmente susceptível aos três antibióticos β -lactâmicos testados (especialmente à amoxicilina), tendo sido visível uma forte inibição do crescimento celular nas concentrações de 0,05 mg/L de amoxicilina e 0,8 mg/L de ceftazidima e de ceftriaxona (Figura 19).

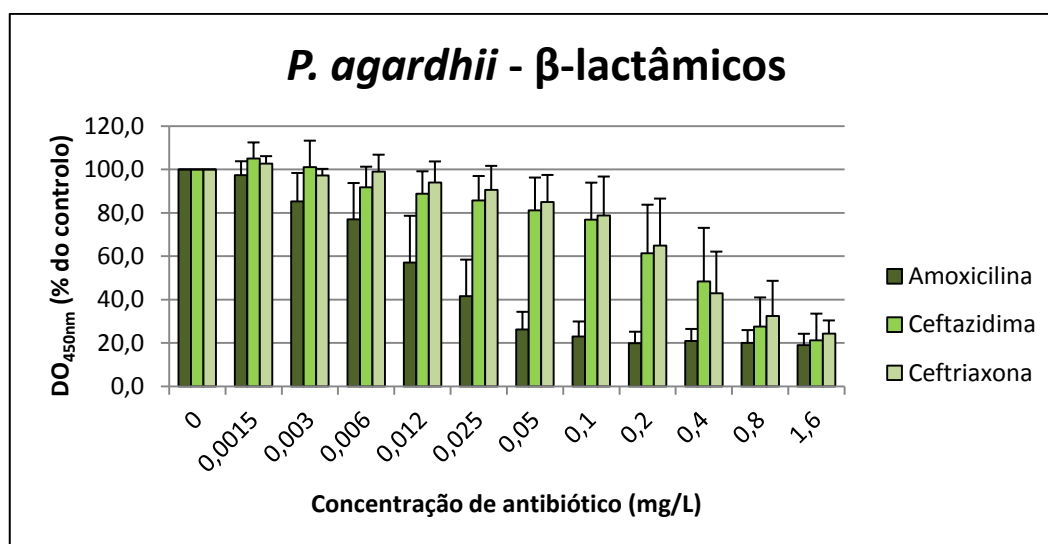


Figura 19 | Curvas dose-resposta de *P. agardhii* para os antibióticos β -lactâmicos.

A espécie *P. mougeotii* não foi susceptível a qualquer das concentrações de amoxicilina testadas (Figura 20). Contudo, e à semelhança de *M. aeruginosa* e de *P. agardhii*, esta espécie

foi susceptível à ceftazidima e à ceftriaxona, tendo sido observada uma elevada diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 0,8 mg/L de ceftazidima e 0,4 mg/L de ceftriaxona (Figura 20).

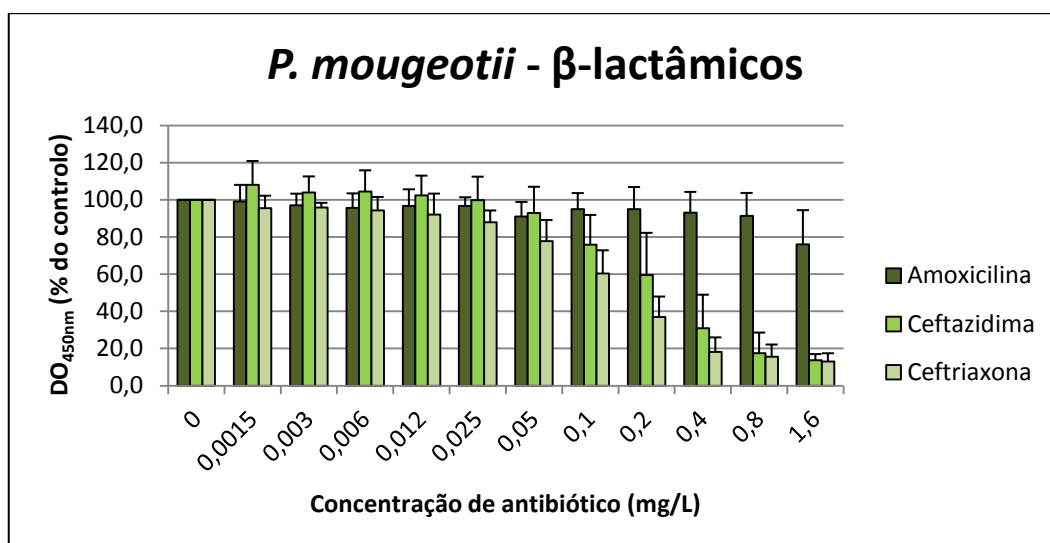


Figura 20 | Curvas dose-resposta de *P. mougeotii* para os antibióticos β -lactâmicos.

3.2.2. Aminoglicosídeos

A espécie *M. aeruginosa* foi susceptível à canamicina e à gentamicina, tendo sido observada uma redução significativa da densidade celular das culturas nas concentrações de 0,2 mg/L destes antibióticos (Figura 21).

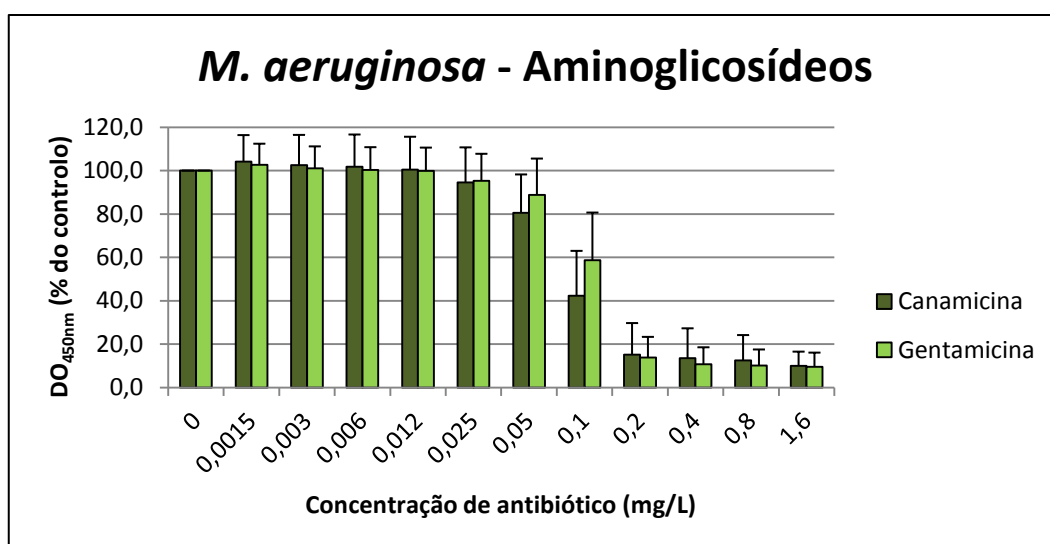


Figura 21 | Curvas dose-resposta de *M. aeruginosa* para os aminoglicosídeos.

A espécie *P. agardhii* foi igualmente susceptível à canamicina e à gentamicina, tendo sido visível uma forte inibição do crescimento celular nas concentrações de 0,4 mg/L de canamicina e 0,2 mg/L de gentamicina (Figura 22).

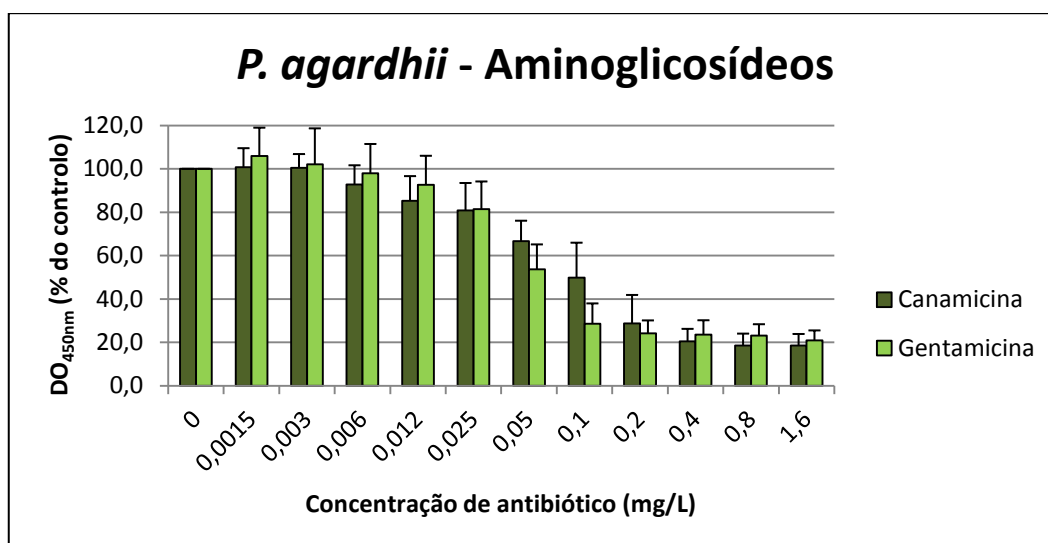


Figura 22 | Curvas dose-resposta de *P. agardhii* para os aminoglicosídeos.

À semelhança de *M. aeruginosa* e de *P. agardhii*, a espécie *P. mougeotii* foi também susceptível à canamicina e à gentamicina, tendo sido observada uma elevada diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 0,4 mg/L de canamicina e 0,8 mg/L de gentamicina (Figura 23).

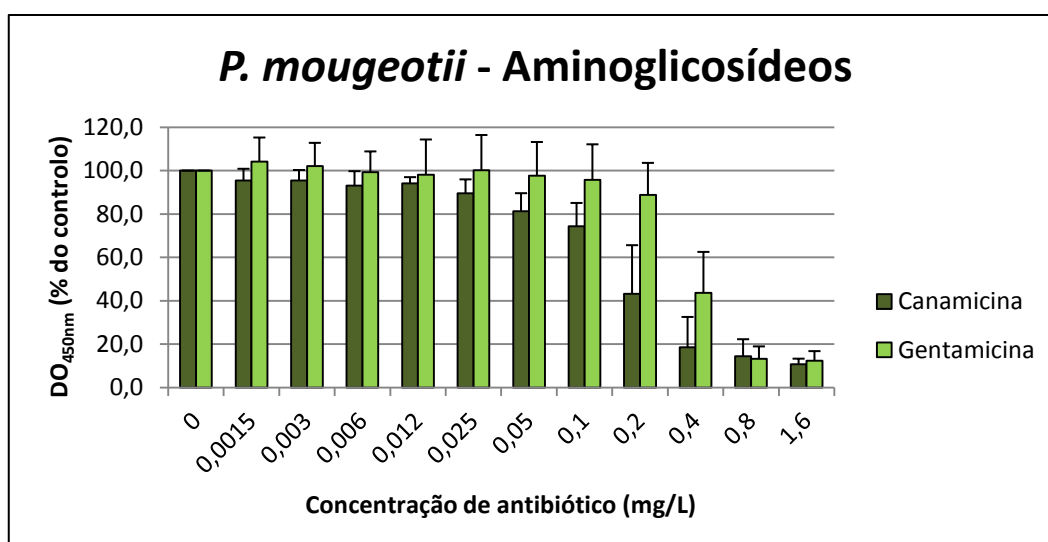


Figura 23 | Curvas dose-resposta de *P. mougeotii* para os aminoglicosídeos.

3.2.3. Tetraciclina

A espécie *M. aeruginosa* foi susceptível apenas a concentrações elevadas de tetraciclina, tendo sido observada uma redução significativa da densidade celular das culturas nas concentrações de 0,8 mg/L – 1,6 mg/L deste antibiótico (Figura 24).

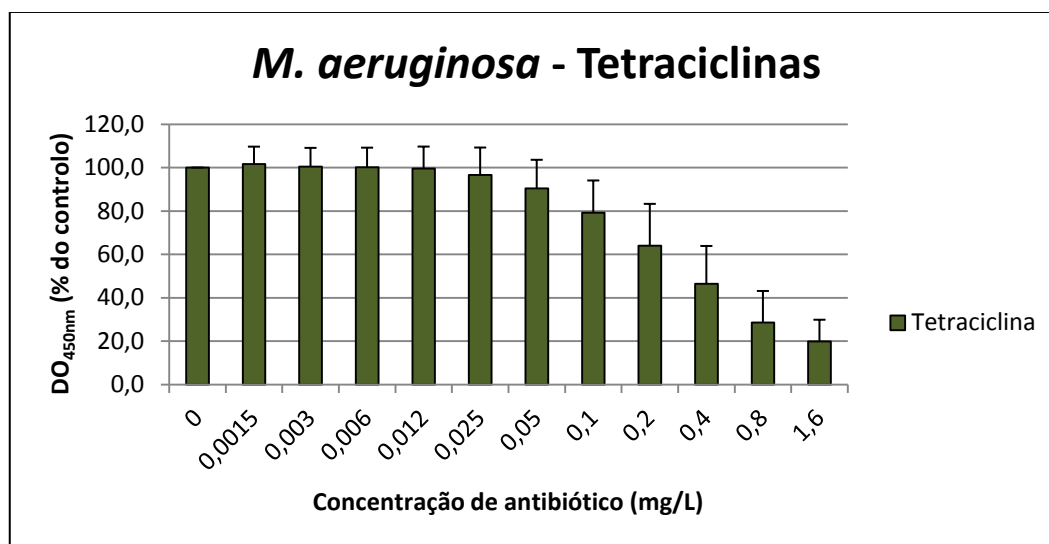


Figura 24 | Curvas dose-resposta de *M. aeruginosa* para as tetraciclina.

A espécie *P. agardhii* foi susceptível à tetraciclina, tendo sido visível uma forte inibição do crescimento celular na concentração de 0,4 mg/L deste antibiótico (Figura 25).

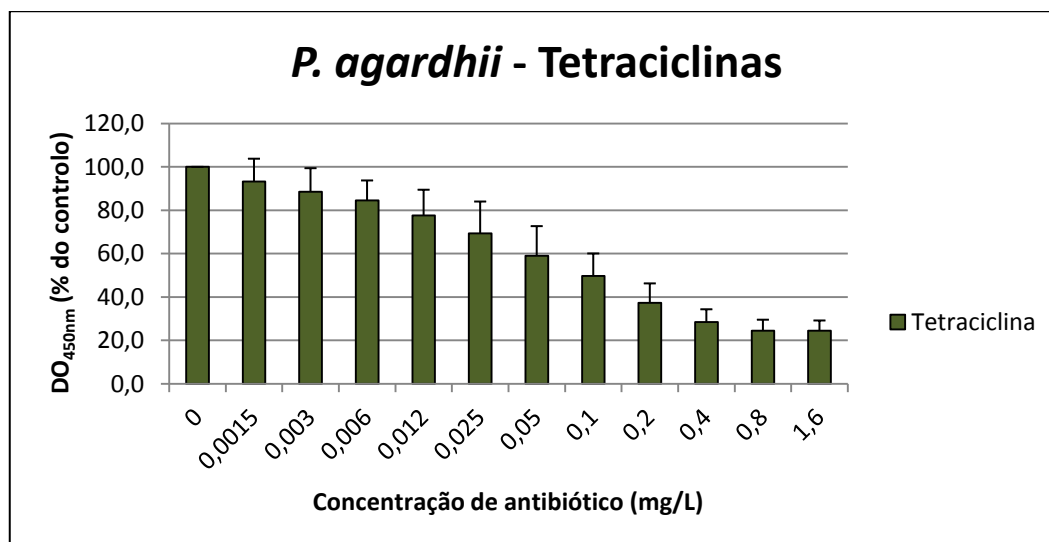


Figura 25 | Curvas dose-resposta de *P. agardhii* para as tetraciclina.

À semelhança de *M. aeruginosa*, a espécie *P. mougeotii* foi também susceptível apenas a concentrações elevadas de tetraciclina, tendo sido observada uma elevada diminuição da viabilidade celular na concentração de 1,6 mg/L deste antibiótico (**Figura 26**).

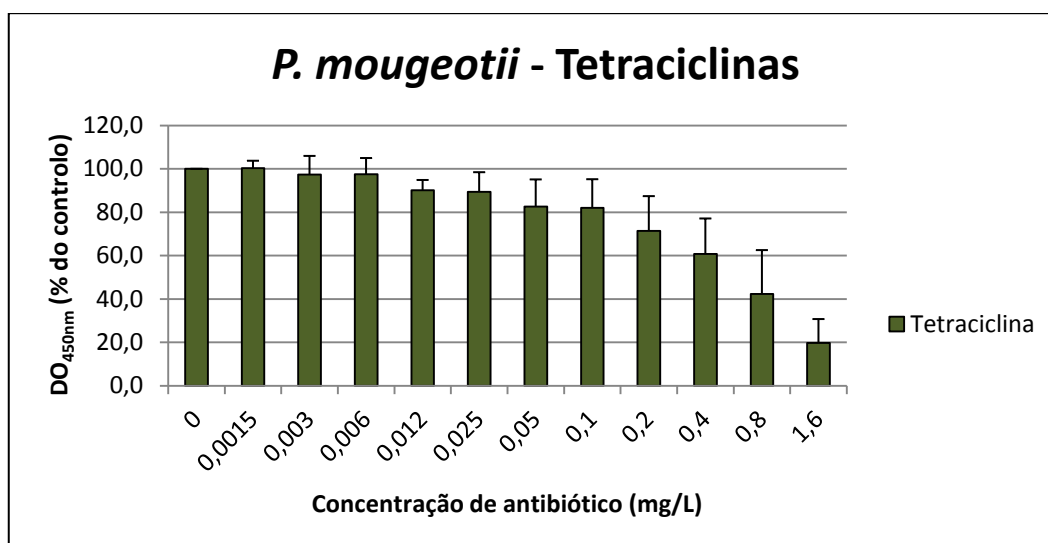


Figura 26 | Curvas dose-resposta de *P. mougeotii* para as tetraciclina.

3.2.4. Quinolonas

A espécie *M. aeruginosa* apresentou uma susceptibilidade reduzida às concentrações de ácido nalidíxico testadas, tendo apenas sido observada uma ligeira redução da densidade celular das culturas na concentração de 1,6 mg/L deste antibiótico (**Figura 27**). No entanto, esta espécie foi susceptível à norfloxacin, tendo sido observada uma redução significativa da densidade celular das culturas na concentração de 0,025 mg/L deste antibiótico (**Figura 27**).

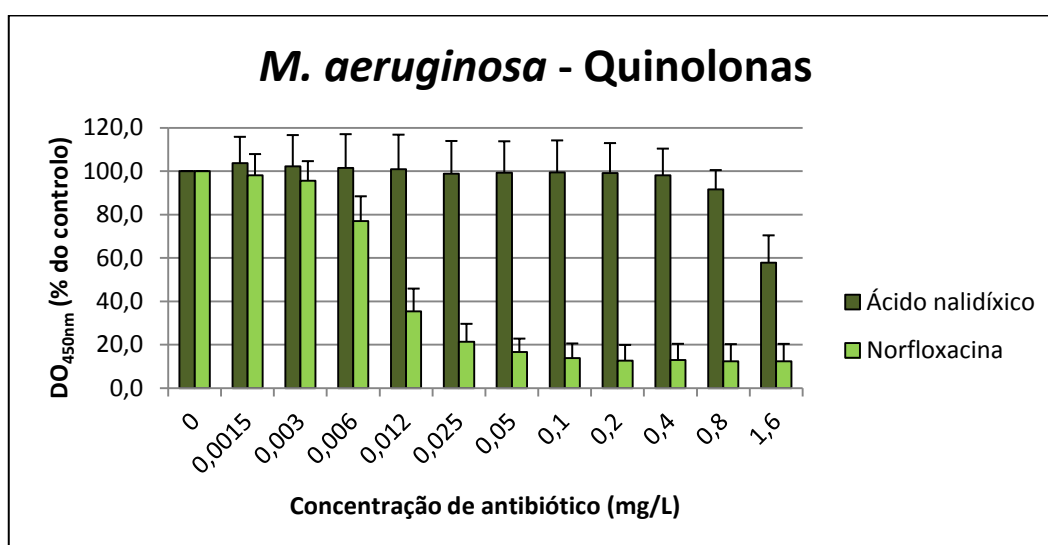


Figura 27 | Curvas dose-resposta de *M. aeruginosa* para as quinolonas.

A espécie *P. agardhii* não foi susceptível a qualquer das concentrações de ácido nalidíxico testadas e foi susceptível apenas a concentrações elevadas de norfloxacina, tendo sido visível alguma inibição do crescimento celular na concentração de 1,6 mg/L deste antibiótico (Figura 28).

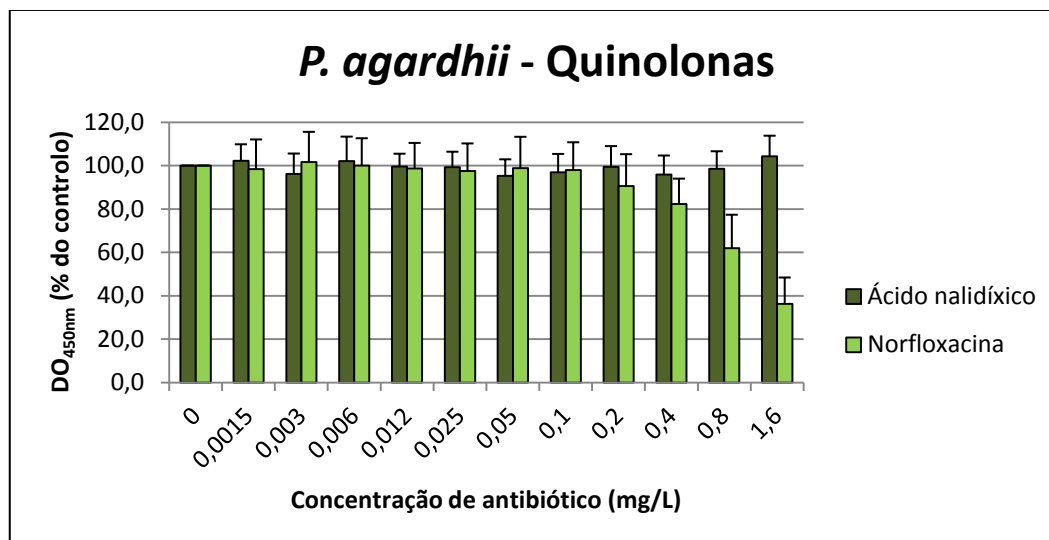


Figura 28 | Curvas dose-resposta de *P. agardhii* para as quinolonas.

A espécie *P. mougeotii* não foi susceptível a qualquer das concentrações de quinolonas testadas (Figura 29).

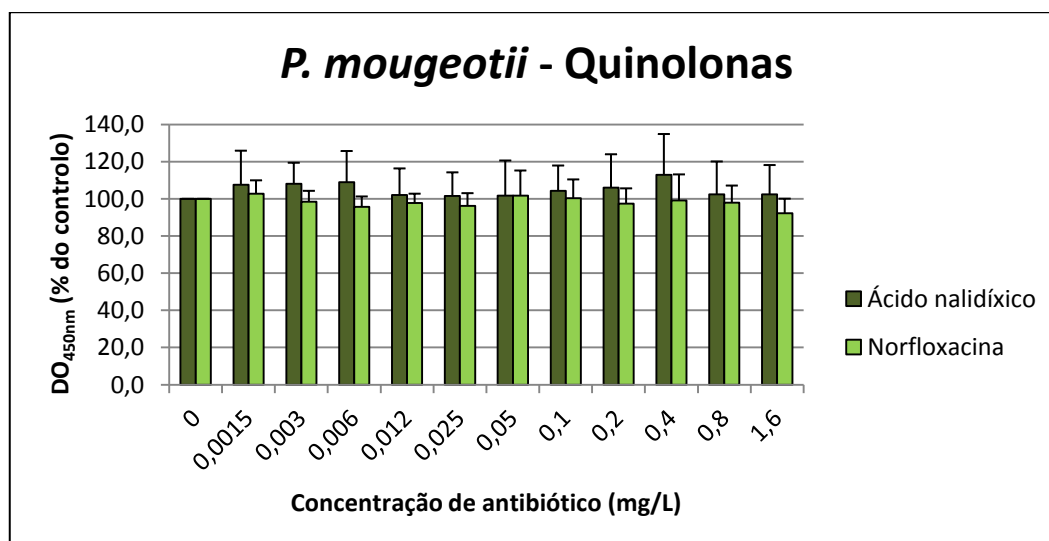


Figura 29 | Curvas dose-resposta de *P. mougeotii* para as quinolonas.

3.2.5. Diaminopiridinas

Nenhuma das três espécies em estudo foi susceptível a qualquer das concentrações de trimetoprim testadas (Figuras 30, 31 e 32).

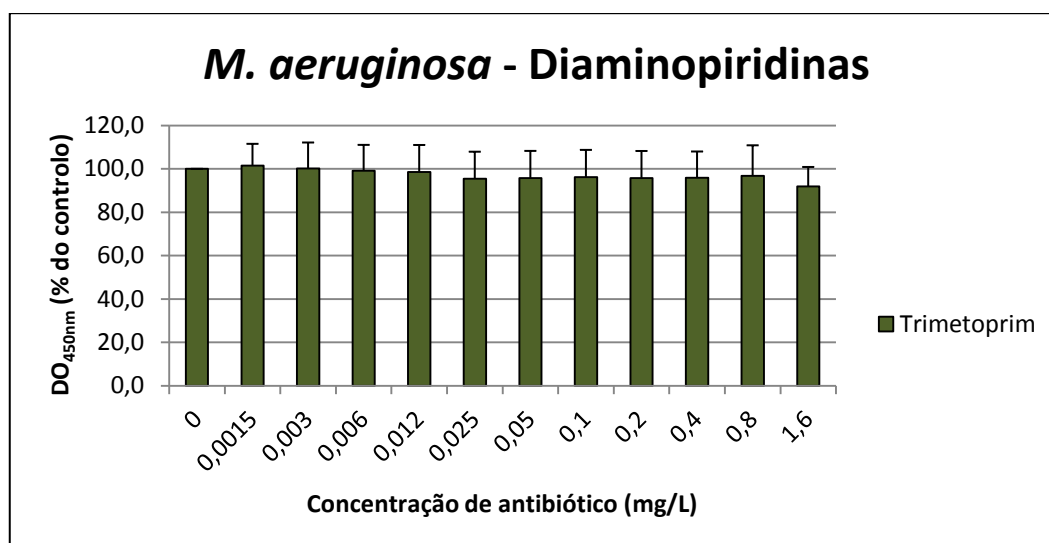


Figura 30 | Curvas dose-resposta de *M. aeruginosa* para as diaminopiridinas.

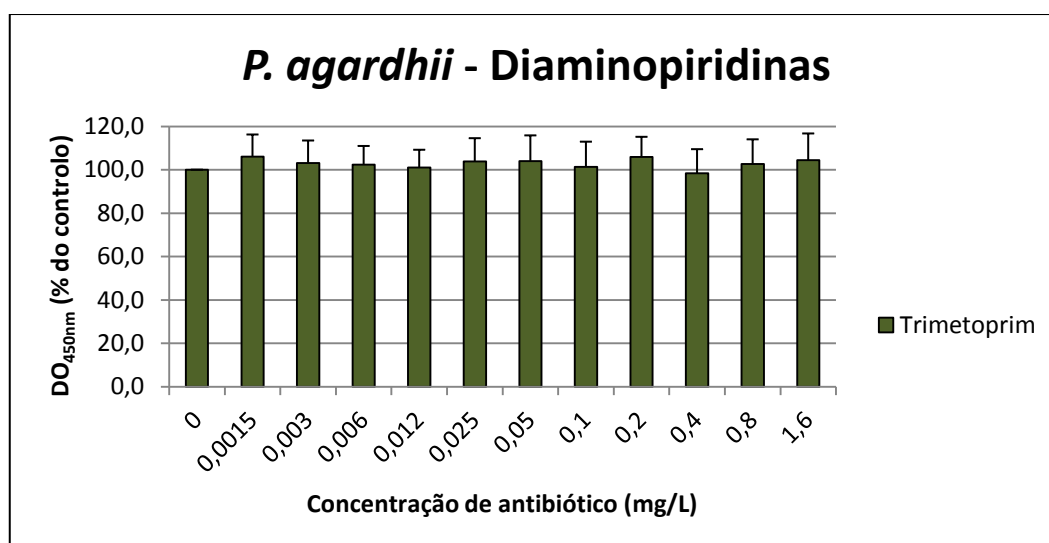


Figura 31 | Curvas dose-resposta de *P. agardhii* para as diaminopiridinas.

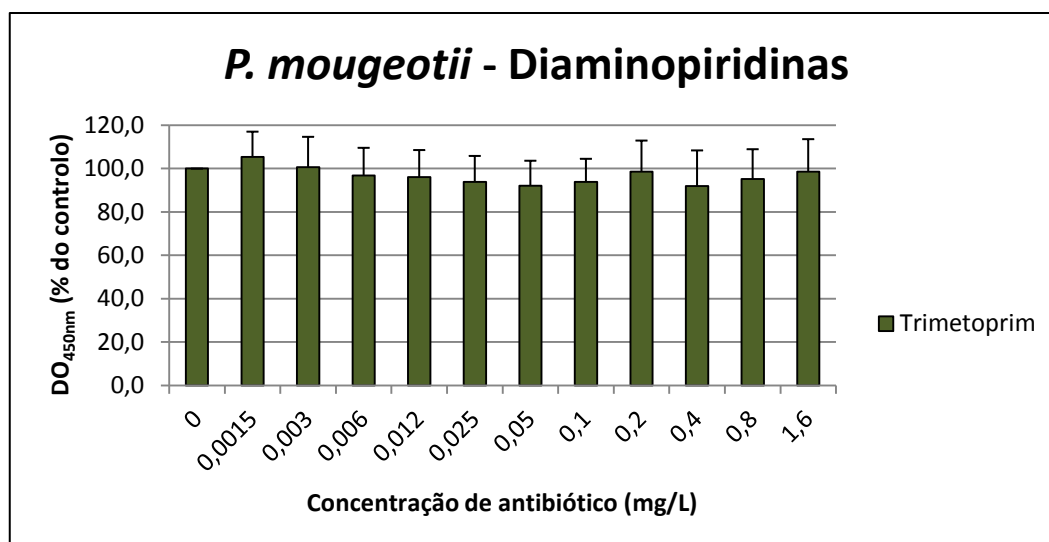


Figura 32 | Curvas dose-resposta de *P. mougeotii* para as diaminopiridinas.

3.3. Concentrações inibitórias mínimas

Após a realização de cada um dos três testes de susceptibilidade, e com base nas observações macroscópicas, microscópicas e nas curvas dose-resposta correspondentes, foram determinados os valores das CIMs dos diferentes antibióticos testados para cada uma das 24 estirpes em estudo. Adicionalmente, e tal como foi referido no ponto 2.3.4., foi ainda realizado um teste de confirmação dos valores das CIMs obtidos em cada um dos testes de susceptibilidade. Os valores apresentados na **Tabela 8** correspondem à mediana dos valores das CIMs obtidos nos três testes de susceptibilidade e nos respectivos testes de confirmação.

De uma forma geral, os valores das CIMs obtidos nos três testes de susceptibilidade corresponderam aos valores obtidos nos respectivos testes de confirmação. Contudo, em alguns casos, os valores das CIMs obtidos nos testes de confirmação foram um pouco superiores. É o caso dos valores das CIMs de algumas estirpes de *M. aeruginosa* expostas à amoxicilina, à tetraciclina e à norfloxacina, nos quais as discrepâncias observadas se podem dever à forma globular das colónias habitualmente formadas por esta espécie. Como se sabe, a formação de colónias em *Microcystis* spp. está relacionada com a sobrevivência da espécie, uma vez que as células exteriores protegem a colónia de factores como a foto-inibição e os predadores (Mulling et al., 2014). Assim, a amoxicilina, a tetraciclina e a norfloxacina podem não ter atingido as células interiores das colónias de maiores dimensões, o que permitiu que essas células crescessem após a sua re-inoculação em meio Z8 fresco, aquando da realização dos testes de confirmação. Este fenómeno não ocorreu nas estirpes de *P. agardhii* e de *P.*

mougeotii, uma vez que estas espécies formam colónias filamentosas, estando todas as células igualmente expostas ao meio circundante.

Uma vez que a CIM corresponde à concentração de antibiótico que inibe completamente o crescimento celular (EUCAST, 2003), considera-se que os valores das CIMs dos ensaios aqui apresentados correspondem aos valores obtidos nos testes de confirmação.

De entre os antibióticos β -lactâmicos testados, a amoxicilina foi o mais eficaz na inibição do crescimento celular das estirpes de *M. aeruginosa* e, especialmente, de *P. agardhii*. As CIMs exibidas por este antibiótico encontraram-se entre 0,1 mg/L e 1,6 mg/L para as estirpes de *M. aeruginosa* e entre 0,025 mg/L e 0,8 mg/L para as estirpes de *P. agardhii*. Por outro lado, nenhuma das estirpes de *P. mougeotii* foi susceptível a qualquer das concentrações de amoxicilina testadas, não tendo sido possível determinar as respectivas CIMs. Todas as estirpes em estudo foram susceptíveis a concentrações médias ou elevadas de ceftazidima e de ceftriaxona (CIMs entre 0,1 mg/L e 1,6 mg/L).

Em relação aos aminoglicosídeos, a canamicina e a gentamicina tiveram efeitos bastante semelhantes entre si e nas estirpes em estudo, apresentando CIMs entre 0,1 mg/L e 0,4 mg/L para as estirpes de *M. aeruginosa* e de *P. agardhii* e entre 0,2 mg/L e 0,8 mg/L para as estirpes de *P. mougeotii*.

A tetraciclina foi eficaz na inibição do crescimento das estirpes de *P. agardhii*, exibindo CIMs entre 0,2 mg/L e 0,8 mg/L. Contudo, as estirpes de *M. aeruginosa* e de *P. mougeotii* apresentaram uma susceptibilidade reduzida às concentrações testadas deste antibiótico, não tendo sido possível, na grande maioria dos casos, determinar as respectivas CIMs.

A norfloxacinina foi eficaz na inibição do crescimento das estirpes de *M. aeruginosa*, apresentando CIMs entre 0,05 mg/L e 0,2 mg/L. Contudo, a susceptibilidade reduzida das estirpes de *P. agardhii* e a ausência de susceptibilidade das estirpes de *P. mougeotii* às concentrações testadas deste antibiótico não permitiram que, na grande maioria dos casos, fossem determinadas as respectivas CIMs.

Por fim, também não foi possível determinar as CIMs do ácido nalidíxico e do trimetoprim para qualquer das estirpes em estudo, uma vez que nenhuma delas foi susceptível a qualquer das concentrações testadas destes antibióticos.

Tabela 8 | CIMs (mg/L) dos antibióticos testados para as 24 estirpes em estudo. Legenda: TS – Teste de susceptibilidade; TC – Teste de confirmação.

Estirpe cianobacteriana	AMX		CAZ		CRO		KAN		GEN		TET		NAL		NOR		TMP	
	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC	TS	TC
LMECYA 50	0,05	0,2	0,4	0,8	0,4	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,2	>1,6	>1,6
LMECYA 91B	0,025	0,1	0,1	0,1	0,8	1,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,05	>1,6	>1,6
LMECYA 108	0,1	0,2	0,4	0,8	0,8	0,8	0,1	0,1	0,2	0,2	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	0,05	0,1	>1,6	>1,6
LMECYA 113	0,025	0,1	0,4	0,4	0,8	0,8	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,05	>1,6	>1,6
LMECYA 142	0,025	0,2	0,2	0,2	0,4	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	>1,6	>1,6	>1,6	0,05	0,2	>1,6	>1,6
LMECYA 151	0,2	1,6	0,2	0,2	0,8	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,1	>1,6	>1,6
LMECYA 159	0,05	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,8	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,05	>1,6	>1,6
LMECYA 167	0,025	0,2	0,2	0,8	0,4	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,8	>1,6	>1,6	>1,6	0,025	0,2	>1,6	>1,6
LMECYA 153A	0,05	0,1	1,6	1,6	1,6	1,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	>1,6	>1,6	1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 230	0,012	0,05	0,4	0,8	0,8	0,8	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	0,8	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 257	0,012	0,025	0,8	1,6	0,8	0,8	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	>1,6	>1,6	1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 269	0,012	0,025	0,4	0,4	0,4	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,05	0,2	>1,6	>1,6	1,6	1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 280	0,1	0,8	1,6	1,6	0,8	1,6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,8	>1,6	>1,6	1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 283	0,05	0,05	0,8	1,6	0,4	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	>1,6	>1,6	1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 292	0,05	0,05	0,8	1,6	0,8	0,8	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4	0,4	>1,6	>1,6	1,6	1,6	>1,6	>1,6
LMECYA 303	0,05	0,05	0,4	0,8	0,4	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	>1,6	>1,6	1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 06224	>1,6	>1,6	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 06225	>1,6	>1,6	0,4	0,8	0,4	0,4	0,2	0,2	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 06226	>1,6	>1,6	0,8	0,8	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 06233	>1,6	>1,6	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 07227	>1,6	>1,6	0,8	0,8	0,4	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 07229	>1,6	>1,6	0,4	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 07230	>1,6	>1,6	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6
LEGE 07231	>1,6	>1,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,8	1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6	>1,6

3.4. Controlo da qualidade dos antibióticos

A potência dos antibióticos testados não foi afectada pelas condições de cultura das cianobactérias durante os 14 dias de duração de cada teste de susceptibilidade, uma vez que as CIMs destes antibióticos foram as esperadas para, pelo menos, uma das estirpes bacterianas padrão utilizadas (**Tabela 10**). Estes resultados asseguram que a susceptibilidade reduzida ou mesmo a ausência de efeito antibiótico em algumas das cianobactérias em estudo não se deveu à degradação ou à perda de actividade dos antibióticos testados.

Tabela 9 | CIMs (mg/L) dos antibióticos testados para as estirpes padrão de *E.coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213), após manutenção das soluções de antibiótico nas condições de cultura das cianobactérias durante 0, 1, 7 e 14 dias.

Antibiótico	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)					<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)				
	Standard	0h	24h	7d	14d	Standard	0h	24h	7d	14d
Amoxicilina	2 – 8	4	4	4	4	0,5 – 2	2	2	4	4
Ceftazidima	0,06 – 0,5	0,125	0,125	0,25	0,25	4 – 16	16	16	8	16
Ceftriaxona	0,03 – 0,12	0,03	0,03	0,06	0,06	1 – 8	4	4	16	16
Canamicina	1 – 4	2	2	2	4	1 – 4	2	2	2	4
Gentamicina	0,25 – 1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12 – 1	1	0,5	0,5	0,5
Tetraciclina	0,5 – 2	1	1	2	2	0,12 – 1	0,5	0,5	1	1
Ácido nalidíxico	1 – 4	2	4	2	2	16 – 64	>32	>32	>32	>32
Norfloxacina	0,03 – 0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5 – 2	2	2	2	2
Trimetoprim	0,5 – 2	1	0,5	0,5	0,5	1 – 4	1	2	2	2

3.5. Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo

Os genes de resistência a antibióticos presentes nas estirpes em estudo (**Tabela 9**) foram detectados por PCR e a sua presença foi confirmada por sequenciação.

Foram encontrados pares de genes *strA-strB*-tipo (de resistência à estreptomicina) numa estirpe de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em quatro estirpes de *P. mougeotii*; genes *sul1*-tipo (de resistência às sulfonamidas) em quatro estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em cinco estirpes de *P. mougeotii*; integrões de classe 1-tipo em duas estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em três estirpes de *P. mougeotii*; genes *qacΔE*-tipo (de resistência aos compostos quaternários de amónio) numa estirpe de *M. aeruginosa* e numa estirpe de *P. agardhii*.

Tabela 10 | Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo.

Estirpe cianobacteriana	β-lactâmicos				Aminoglicosídeos		Tetraciclina		Quinolonas								Diaminopiridinas	
	ampC	bla _{OXA}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	strA-strB	aac6'lb	tetA	tetB	aac6'lb	qepA	qnrA	qnrB	qnrC	qnrD	qnrS	oqxAB	dfrA1	dfrA17
LMECYA 50	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 91B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 153A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 280	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 283	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 292	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 303	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 06224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 06225	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 06226	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 06233	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07227	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07229	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 10 (cont.)

Estirpe cianobacteriana	Sulfonamidas			Integrões			Outros	
	<i>su1</i>	<i>su2</i>	<i>su3</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>int3</i>	<i>qacΔE</i>	<i>orf513</i>
LMECYA 50	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 91B	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 108	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 113	+	-	-	+	-	-	-	-
LMECYA 142	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 151	+	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 159	+	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 167	+	-	-	+	-	-	+	-
LMECYA 153A	+	-	-	+	-	-	+	-
LMECYA 230	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 257	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 269	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 280	+	-	-	+	-	-	-	-
LMECYA 283	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 292	-	-	-	-	-	-	-	-
LMECYA 303	+	-	-	+	-	-	-	-
LEGE 06224	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 06225	+	-	-	+	-	-	-	-
LEGE 06226	+	-	-	+	-	-	-	-
LEGE 06233	+	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07227	-	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07229	+	-	-	-	-	-	-	-
LEGE 07230	+	-	-	+	-	-	-	-
LEGE 07231	-	-	-	-	-	-	-	-

4. Discussão

As cianobactérias são importantes produtores primários nos ecossistemas aquáticos, desempenhando papéis fundamentais como a produção de oxigénio, a fixação de azoto e o fornecimento dos nutrientes necessários à sobrevivência de uma grande diversidade de organismos (Vincent, 2009; Kulasooriya, 2011; González-Pleiter et al., 2013).

Tendo em conta a relevância dos papéis que desempenham e o facto de serem particularmente susceptíveis a alguns dos contaminantes cuja presença é mais frequente nos ambientes hídricos (López-Rodas et al., 2006), é da máxima importância avaliar como é que as cianobactérias e, conseqüentemente, como é que os ecossistemas aquáticos, são afectados pela crescente poluição antibiótica do meio ambiente. Com este propósito, e partindo do pressuposto de que as cianobactérias são realmente susceptíveis a um grande número de antibióticos (van der Grinten et al., 2010; González-Pleiter et al., 2013; Kolar et al., 2014), a sua utilização como organismos-teste para prever a concentração destas drogas no ambiente é recomendada pela *European Medicines Evaluation Agency* (EMA) (EMA, 2006).

Contudo, as cianobactérias possuem uma elevada capacidade de adaptação a pressões ambientais (Cohen et al., 2006), tendo algumas estirpes sido já descritas como resistentes a antibióticos (Prasanna et al., 2010). No entanto, a resistência destes organismos a estes compostos nunca foi abordada de uma forma sistemática, pelo que o papel das cianobactérias no resistoma hídrico continua por elucidar.

Assim, o presente trabalho teve como principais objectivos avaliar o fenótipo e o genótipo de susceptibilidade a antibióticos de cianobactérias isoladas de águas doces superficiais e de águas residuais. Para tal, foram estudadas 24 estirpes pertencentes às espécies *M. aeruginosa* (oito estirpes), *P. agardhii* (oito estirpes) e *P. mougotii* (oito estirpes).

4.1. Fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos

A avaliação do fenótipo de susceptibilidade das cianobactérias aos antibióticos permitiu concluir que a resposta das cianobactérias em estudo aos antibióticos testados dependeu tanto do tipo e da concentração de antibiótico, como da espécie cianobacteriana em questão.

4.1.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os resultados obtidos com os antibióticos β -lactâmicos mostram que todas as estirpes de *M. aeruginosa* e de *P. agardhii* foram susceptíveis aos três antibióticos testados, com CIMs entre 0,025 mg/L e 1,6 mg/L. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que

apontam para os efeitos deletérios de alguns antibióticos pertencentes a esta classe no crescimento de diferentes espécies cianobacterianas: em *M. aeruginosa*, foram reportadas concentrações efectivas 50% (CE₅₀) de 0,0037 mg/L (Lützhøft et al., 1999) e 0,008 mg/L (Liu et al., 2012) de amoxicilina; em *Synechocystis* sp., foram observados efeitos inibitórios da amoxicilina ao nível da fotossíntese para concentrações de 50 mg/L (Pan et al., 2008); em *Anabaena* sp. foi descrita susceptibilidade a 0,01 mg de amoxicilina (Prasanna et al., 2010) e em *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp. foi descrita susceptibilidade a 0,03 mg de ceftazidima e de ceftriaxona (Prasanna et al., 2010).

Ainda que também tenham sido susceptíveis à ceftazidima e à ceftriaxona, nenhuma das estirpes de *P. mougeotii* foi susceptível a qualquer das concentrações de amoxicilina testadas. Embora estes três antibióticos pertençam à classe dos β -lactâmicos, a amoxicilina faz parte da família das penicilinas, enquanto que a ceftazidima e a ceftriaxona fazem parte da família das cefalosporinas de terceira geração (Masoud et al., 2014), o que significa que existem diferenças estruturais entre o primeiro antibiótico e os dois últimos (Masoud et al., 2014). Estas diferenças poderão justificar a menor susceptibilidade de *P. mougeotii* à amoxicilina, em relação às cefalosporinas. De facto, sabe-se que a estrutura dos antibióticos β -lactâmicos (carga, hidrofiliidade, tamanho) é um factor determinante na interacção com as porinas presentes nas paredes celulares bacterianas, através das quais estes compostos entram na célula (Delcour, 2009). Por outro lado, a composição da parede celular também determina a permeabilidade das bactérias aos antibióticos (Delcour, 2009), e é sabido que *P. mougeotii* é uma das espécies cianobacterianas que apresenta paredes celulares com uma camada de peptidoglicano mais espessa e mais compacta (Suda et al., 2002; Komárek e Komárková, 2004). Assim, pode supor-se que a permeabilidade de *P. mougeotii* à amoxicilina seja inferior à sua permeabilidade à ceftazidima e à ceftriaxona e, conseqüentemente, que esta espécie seja menos susceptível a este antibiótico.

Foi ainda colocada a hipótese de a não-susceptibilidade das estirpes de *P. mougeotii* à amoxicilina se dever à presença de um ou mais genes de resistência a este antibiótico. Embora não tenham sido detectados genes que confirmem resistência à amoxicilina nas estirpes em estudo, poderá supor-se que, de facto, estes estejam presentes, mas que os *primers* usados para a sua detecção não tenham sido os mais adequados para cianobactérias. Por outro lado, o facto de as oito estirpes da espécie apresentarem o mesmo fenótipo parece ser indicativo de que esta é, provavelmente, uma característica da espécie, que não se encontra relacionada com o mecanismo de transferência horizontal de genes de resistência provenientes de outros micro-organismos.

À semelhança do fenótipo apresentado pela espécie *P. mougeotii* relativamente à amoxicilina, foi também descrita susceptibilidade reduzida a antibióticos β -lactâmicos em algumas espécies cianobacterianas: em *Anabaena* sp., foi reportada uma CE_{50} de 56,3 mg/L de amoxicilina (González-Pleiter et al., 2013); em *Chroococidiopsis* sp., *Gloeocapsa* sp. e *Pleurocapsa* sp., foi observada resistência a concentrações de 10 mg/L de ampicilina, carbenicilina e penicilina (Reynaud e Franche, 1986); estirpes de *Anabaena* sp. foram descritas como resistentes a 0,01 mg de amoxicilina e a 0,03 mg de ceftazidima (Prasanna et al., 2010) e estirpes de *Nostoc* sp. como resistentes a 0,01 mg de amoxicilina e a 0,03 mg de ceftriaxona (Prasanna et al., 2010). Adicionalmente, também já se encontra reportada a actividade de β -lactamases em extractos de *Anabaena variabilis*, *Calothrix membranacea* e *Lyngbya spiralis* (Padmapriya e Anand, 2010), embora os enzimas ainda não tenham sido purificados e caracterizados. Em *Thermosynechococcus enlongatus*, foi identificada uma putativa β -lactamase (Urbach et al., 2008), embora continue por explicar a sua susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos. Em *M. aeruginosa*, foi ainda descrito que, em determinadas concentrações, a amoxicilina pode estimular o crescimento cianobacteriano (Liu et al., 2012; Liu et al., 2015).

Em resumo, a informação disponível acerca dos efeitos dos antibióticos β -lactâmicos no crescimento cianobacteriano ainda é escassa e, de alguma forma, contraditória, não sendo ainda possível obter uma conclusão definitiva acerca do fenótipo de susceptibilidade de cianobactérias a esta classe de antibióticos.

4.1.2. Aminoglicosídeos

Em relação aos aminoglicosídeos, os resultados obtidos mostram que todas as estirpes em estudo foram susceptíveis à canamicina e à gentamicina, apresentando CIMs entre 0,1 mg/L e 0,8 mg/L. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que apontam para a susceptibilidade de algumas espécies cianobacterianas a antibióticos pertencentes a esta classe: estirpes de *Anabaena* sp. e de *Nostoc* sp. foram descritas como susceptíveis a 0,03 mg de canamicina e a 0,01 mg de gentamicina (Prasanna et al., 2010); o crescimento celular de *Synechocystis* sp. foi fortemente inibido por concentrações entre 1 mg/L e 10 mg/L de gentamicina (Cameron e Pakrasi, 2011).

No entanto, foram também observados fenótipos de susceptibilidade reduzida a aminoglicosídeos em algumas espécies cianobacterianas: em *Chroococidiopsis* sp., *Dermocarpa* sp., *Dermocarpella* sp. e *Pleurocapsa* sp., foi reportada resistência à concentração

de 10 mg/L de canamicina (Reynaud e Franche, 1986); em *Nodularia spumigena* (Hong et al., 2010) e em *Phormidium animalis* (Vázquez-Martínez et al., 2004) foi descrito o crescimento de culturas em concentrações de 100 mg/L e 150 mg/L de canamicina, respectivamente; em *Synechococcus* sp., foi observada resistência à concentração de 10 mg/L de gentamicina (Reynaud e Franche, 1986).

Para além do seu principal mecanismo de acção (inibição da síntese proteica), os aminoglicosídeos podem também induzir citotoxicidade pela produção de espécies reactivas de oxigénio (Cameron e Pakrasi, 2011). E se, por um lado, estes mecanismos podem justificar a susceptibilidade das cianobactérias a esta classe de antibióticos, um estudo recente sugeriu que o glutatióno (GSH) contribui para a resistência à gentamicina em *Synechocystis* sp. (Cameron e Pakrasi, 2011). De facto, as cianobactérias possuem glutatióno-transferases específicas e elevados níveis de GSH citosólico (Wiktelius e Stenberg, 2007). Contudo, se o GSH pode estar na base da resistência de algumas cianobactérias aos aminoglicosídeos, esse mecanismo não explica os fenótipos de susceptibilidade observados nas restantes.

4.1.3. Tetraciclinas

Os resultados obtidos mostram que as estirpes de *P. agardhii* foram susceptíveis à tetraciclina, com CIMs entre 0,2 mg/L e 0,8 mg/L. No entanto, este antibiótico não inibiu o crescimento das estirpes de *M. aeruginosa* e de *P. mougeotii*, pelo que não foi possível determinar as respectivas CIMs. Uma revisão da literatura disponível mostra que foram observados diferentes graus de susceptibilidade de algumas espécies cianobacterianas a antibióticos pertencentes à classe das tetraciclinas: estirpes de *Anabaena* sp. e de *Nostoc* sp. foram descritas como susceptíveis a intervalos entre 0,03 mg e 0,05 mg de tetraciclina (Lorenz e Krumbein, 1984; Prasanna et al., 2010); em *Anabaena* sp., foram reportadas CE₅₀ de 2,7 mg/L de oxitetraciclina (Kolar et al., 2014) e de 6,2 mg/L de tetraciclina (González-Pleiter et al., 2010); em *M. aeruginosa*, foram observadas CE₅₀ de 0,09 mg/L de tetraciclina (Halling-Sørensen et al., 2000) e de 0,207 mg/L (Lützhøft et al., 1999) e 5,4 mg/L (van der Grinten et al., 2010) de oxitetraciclina; em *Dermocarpella* sp. e *Synechococcus* sp. foi reportada resistência a 10 mg/L de tetraciclina (Reynaud e Franche, 1986).

Dependendo da sua carga, o transporte de tetraciclina para o interior da célula pode dar-se por difusão através da membrana ou ser mediado por porinas (Delcour, 2009). Por sua vez, a difusão através da membrana é determinada pelos respectivos lipopolissacaridos (Delcour, 2009). Foi descrito que a quantidade e estrutura dos lipopolissacaridos das cianobactérias

pode diferir de espécie para espécie (Bernardová et al., 2008; Snyder et al., 2009). Assim, pode colocar-se a hipótese de a menor susceptibilidade de *M. aeruginosa* e de *P. mougeotii* à tetraciclina estar relacionada com a especificidade dos seus lipopolissacáridos e com a eventual limitação da entrada do antibiótico nas células. Por outro lado, e tal como referido no ponto 3.3., a forma globular das colónias de *Microcystis* spp. poderá limitar o acesso de antibióticos às células do núcleo das colónias, o que pode justificar a susceptibilidade reduzida desta espécie à tetraciclina.

Apesar de se poder hipotetizar que as estirpes de *M. aeruginosa* e *P. mougeotii* possuem genes de resistência que lhes conferem susceptibilidade reduzida à tetraciclina, esse facto não se veio a comprovar aquando da realização dos PCRs. Adicionalmente, o facto de o padrão de susceptibilidade à tetraciclina ser muito semelhante entre as estirpes pertencentes a cada uma destas espécies, indica que esta susceptibilidade reduzida deverá ser uma característica intrínseca das espécies em questão.

4.1.4. Quinolonas

Em relação às quinolonas, os resultados obtidos levantam a hipótese de as cianobactérias serem intrinsecamente não-susceptíveis ao ácido nalidíxico, uma vez que todas as estirpes em estudo mantiveram a viabilidade e o crescimento celular quando expostas a qualquer das concentrações deste antibiótico. No entanto, os padrões de susceptibilidade à norfloxacina diferiram bastante entre espécies, oscilando entre a elevada susceptibilidade da espécie *M. aeruginosa* (CIMs entre 0,05 mg/L e 0,2 mg/L) e a não-susceptibilidade da espécie *P. mougeotii*. Esta resposta distinta das estirpes de *M. aeruginosa* aos dois antibióticos testados não foi surpreendente, já que que o ácido nalidíxico é uma quinolona menos potente do que a norfloxacina (Andersson e MacGowan, 2003).

A actividade antibiótica das quinolonas ocorre pela inibição da ADN girase e da topoisomerase IV, dois enzimas fundamentais nos processos de replicação e transcrição do ADN (Jacoby, 2005; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012). Por seu turno, os mecanismos de resistência a estes antibióticos podem passar pela modificação das características das suas estruturas-alvo ou pela redução das concentrações destas drogas no interior da célula, que pode ser conseguida pela acção de bombas de efluxo ou pela diminuição da permeabilidade membranar (Jacoby, 2005; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Wright, 2010; Cambau e Guillard, 2012; Blair et al., 2014). No caso das bactérias de Gram-negativo, a diminuição da permeabilidade membranar pode ser alcançada

por mudanças ao nível da expressão das porinas (Jacoby, 2005; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Blair et al., 2014). Embora a estrutura geral das paredes celulares cianobacterianas seja semelhante à de bactérias de Gram-negativo, existem algumas diferenças importantes a apontar, nomeadamente o facto de a camada de peptidoglicano ser bastante mais espessa nas cianobactérias, e destas apresentarem porinas com uma menor condutância, o que lhes confere protecção contra alguns agentes nocivos presentes nos seus *habitats* naturais, tais como toxinas e antibióticos (Hoyczyk e Hansel, 2000). Considerando estes factos, é legítimo pensar que a ausência de susceptibilidade das cianobactérias em estudo às concentrações de ácido nalidíxico testadas se deve, muito provavelmente, à baixa permeabilidade destes organismos a este antibiótico.

As diferenças na espessura e na permeabilidade das paredes celulares das espécies cianobacterianas também podem explicar as diferenças na susceptibilidade à norfloxacin observadas nas estirpes em estudo. Como já foi referido, a espessura da camada de peptidoglicano das paredes celulares cianobacterianas pode variar consideravelmente entre géneros e espécies, sendo particularmente espessa e compacta em alguns membros da ordem Oscillatoriales, entre os quais se destacam *P. agardhii* e, especialmente, *P. mougeotii* (Suda et al., 2002; Komárek e Komárková, 2004). Assim, supõe-se que, pelo facto de apresentar uma parede celular menos espessa, a espécie *M. aeruginosa* tenha sido mais permeável à norfloxacin e, conseqüentemente, mais susceptível.

À semelhança dos resultados obtidos neste trabalho, foi reportada resistência a 0,03 mg de ácido nalidíxico em *Anabaena* sp. e *Synechococcus* sp. (Lorenz and Krumbein, 1984; Prasanna et al., 2010). No entanto, numa outra estirpe de *Anabaena* sp. e em estirpes de *Nostoc* sp. foi descrita susceptibilidade a esta mesma quantidade de antibiótico (Prasanna et al., 2010).

Tal como acontece para outros antibióticos, ainda não é possível retirar uma conclusão definitiva no que diz respeito aos efeitos das quinolonas no crescimento cianobacteriano, dada a escassez de dados e o seu carácter contraditório.

4.1.5. Diaminopiridinas

À semelhança do que foi descrito para o ácido nalidíxico, os resultados obtidos colocam também a hipótese de as cianobactérias serem intrinsecamente não-susceptíveis ao trimetoprim, uma vez que todas as estirpes em estudo mantiveram a viabilidade e o crescimento celular após exposição a qualquer das concentrações testadas deste antibiótico.

O trimetoprim actua ao nível da via da timidilato sintase (ThyA) do metabolismo do ácido fólico, inibindo a acção do enzima dihidrofolato reductase (folA), que catalisa a síntese de ácido tetrahidrofólico a partir de ácido dihidrofólico (Myllykallio et al., 2003; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Cambau e Guillard, 2012). Durante muito tempo, pensou-se que, dada a importância das suas funções, os genes *thyA* e *folA* fossem fundamentais para a sobrevivência de qualquer bactéria (Myllykallio et al., 2003). Contudo, tem vindo a ser descoberto um número crescente de bactérias que não possui estes genes e que utiliza uma via alternativa da timidilato sintase (ThyX), envolvendo outra dihidrofolato reductase, para sintetizar as moléculas de folato reduzidas que são necessárias para o metabolismo intermediário bacteriano (Myllykallio et al., 2003). Adicionalmente, também já foram encontradas algumas cianobactérias que utilizam esta via alternativa (Myllykallio et al., 2003; Liu e Yang, 2004). Assim, se a presença de vias alternativas à ThyA e, conseqüentemente, ao enzima folA, for uma característica comum entre as cianobactérias, pode concluir-se que estes organismos são intrinsecamente não-susceptíveis ao trimetoprim.

Estudos anteriores reportam CE₅₀ de 6,9 mg/L (van der Grinten et al., 2010) e 112 mg/L (Lützhøft et al., 1999; Halling-Sørensen et al., 2000) de trimetoprim em *M. aeruginosa*. Adicionalmente, foi descrita uma CE₅₀ de 253 mg/L de trimetoprim em *Anabaena flos-aquae* (Kolar et al., 2014) e em estirpes de *Anabaena* sp. e de *Nostoc* sp. foi observada resistência a 0,025 mg deste antibiótico (Prasanna et al., 2015). Embora seja difícil comparar os resultados destes estudos, atendendo à diversidade de metodologias e de *endpoints* de efeito utilizados, todos eles sugerem que as cianobactérias apresentam uma susceptibilidade reduzida ao trimetoprim.

4.2. Genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias em estudo

Como já foi referido na introdução, a transferência horizontal de genes representa o modo mais frequente de aquisição de genes de resistência a antibióticos, podendo ocorrer por conjugação, transdução ou transformação bacteriana (Furuya e Lowy, 2006; Tenover, 2006; Džidić et al., 2008; Bockstael e Aerschot, 2009; Blair et al., 2014). Contudo, este mecanismo não é exclusivo para genes de resistência, sendo comum a observação de transferência horizontal de outros genes não associados à resistência a antibióticos entre diferentes cianobactérias (Tooming-Klunderud et al., 2013), bem como entre cianobactérias e bactérias (Zhaxybayeva et al., 2006; Shi e Falkowski, 2007). Assim sendo, e sabendo que, nos seus *habitats* naturais, as cianobactérias estão frequentemente expostas a antibióticos, bactérias

resistentes e a genes de resistência, é provável que estes organismos adquiram esses genes e os transfiram para outras bactérias, nomeadamente para bactérias patogénicas.

Neste trabalho, foi efectuada a pesquisa de genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos, a aminoglicosídeos, a tetraciclina, a quinolonas, a diaminopiridinas, a sulfonamidas e a compostos quaternários de amónio. Adicionalmente, foi também investigada a presença de algumas unidades genéticas móveis que geralmente se encontram associadas à disseminação da resistência a vários antibióticos.

De acordo com os resultados obtidos, não foi encontrado nenhum gene de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, às tetraciclina, às quinolonas e às diaminopiridinas em qualquer das estirpes em estudo. No entanto, é importante salientar que toda a metodologia seguida, nomeadamente os *primers* e as condições de PCR utilizadas, foi optimizada especificamente para bactérias. Ou seja, a inexistência de padronização das metodologias para cianobactérias poderá subestimar a presença dos referidos genes de resistência. Por outro lado, é também importante ter em consideração que existem muitos outros genes de resistência a estes antibióticos que não foram pesquisados e que podem estar presentes nas estirpes em estudo. Estas dificuldades e incertezas poderão ser ultrapassadas através da pesquisa de genes de resistência no genoma completo das cianobactérias em questão.

No entanto, neste trabalho foi identificado um par de genes *strA-strB*-tipo numa estirpe de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em quatro estirpes de *P. mougeotii*. O produto deste par de genes confere resistência à estreptomicina através da inactivação deste aminoglicosídeo (Zhang et al., 2009). Uma vez que não foi possível a realização dos testes de susceptibilidade das cianobactérias a este antibiótico, é prioritário que, num trabalho posterior, se avalie o fenótipo destas estirpes a este antibiótico e se verifique se, de facto, as oito estirpes que possuem o par de genes em questão apresentam fenótipos de resistência à estreptomicina. Com efeito, um estudo anterior já reportou o crescimento de culturas de *Phormidium animalis* na concentração de 100 mg/L de estreptomicina (Vázquez-Martínez et al., 2004).

Um gene *sul1*-tipo foi também encontrado em quatro estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em cinco estirpes de *P. mougeotii*. Este gene confere resistência aos antibióticos pertencentes à classe das sulfonamidas, já que codifica a informação necessária para a síntese de uma forma alternativa do enzima dihidropteroato sintetase que não é afectada por estes antibióticos (Antunes et al., 2005; Zhang et al., 2009; Frye e Jackson, 2013). Uma vez que também não foi possível a realização dos testes de susceptibilidade das

cianobactérias a sulfonamidas, é bastante importante que, num estudo posterior, o fenótipo destas estirpes seja avaliado e se confirme se, realmente, as 12 estirpes que possuem o gene em questão apresentam fenótipos de resistência a estes antibióticos. Num estudo anterior, foi reportada resistência a 0,3 mg de sulfanilamida em *Anabaena* sp. e em *Synechococcus* sp. (Lorenz e Krumbein, 1984).

Um integrão de classe 1-tipo foi encontrado em duas estirpes de *M. aeruginosa*, em três estirpes de *P. agardhii* e em três estirpes de *P. mougeotii*. Estes integrões desempenham um papel de destaque na problemática da resistência a antibióticos, uma vez que podem capturar e expressar uma grande diversidade de genes de resistência (Gillings et al., 2008). Para além disso, são frequentemente encontrados em plasmídeos e transposões, o que facilita a sua transferência horizontal para uma grande variedade de agentes patogénicos (Gillings et al., 2008). Geralmente, os integrões de classe 1 possuem uma região conservada, da qual faz parte o gene *sul1* e o gene *qacΔE*, que confere resistência aos antisépticos pertencentes ao grupo dos compostos quaternários de amónio, uma vez que codifica proteínas de efluxo que exportam estes compostos para fora da célula (Kazama et al., 1999). Adicionalmente, também é possível encontrar uma região variável, que pode conter muitos outros genes de resistência a antibióticos (Gillings et al., 2008). Neste trabalho, observou-se que apenas duas das oito estirpes onde foi encontrado o integrão de classe 1-tipo possuíam o gene *qacΔE*. Por outro lado, em todas as estirpes onde foi encontrado este integrão, foi também encontrado o gene *sul1*. De futuro, seria interessante sequenciar e analisar a sequência completa deste integrão, de forma a investigar se outros genes de resistência a antibióticos se encontram na sua região variável.

Em relação à distribuição dos genes de resistência a antibióticos nas cianobactérias estudadas, observou-se que, no total, foram encontrados oito genes nas estirpes de *M. aeruginosa*, dez genes nas estirpes de *P. agardhii* e 12 genes nas estirpes de *P. mougeotii*. Por outro lado, a percentagem de estirpes que apresenta, pelo menos, um gene de resistência é de 63% para *M. aeruginosa*, 38% para *P. agardhii* e 75% para *P. mougeotii*. Como seria de esperar, as estirpes de *P. mougeotii* foram aquelas que apresentaram uma maior prevalência de genes de resistência a antibióticos, uma vez que foram isoladas a partir de amostras de água residual de uma ETAR que, como se sabe, é um local propício à transferência horizontal deste tipo de genes, dada a elevada concentração de bactérias resistentes nesses locais (Rizzo et al., 2013).

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

1. Independentemente da sua espécie e do seu local de colheita, e embora não possuam genes de resistência a estes antibióticos, nenhuma das estirpes em estudo foi susceptível a qualquer das concentrações de ácido nalidíxico e de trimetoprim testadas. Este facto sugere que as cianobactérias apresentam uma resistência intrínseca a estes antibióticos, que resulta de características estruturais e / ou funcionais comuns aos membros deste filo;

2. As estirpes de *P. mougeotii* apresentaram susceptibilidade reduzida a mais antibióticos, CIMs mais elevadas e genes de resistência a antibióticos em mais estirpes do que as outras espécies. Este último ponto sugere que estas estirpes tenham adquirido os genes de resistência a antibióticos no seu *habitat*, já que as ETARs são locais propícios à transferência horizontal deste tipo de genes entre diferentes micro-organismos;

3. Cerca de 60% das estirpes em estudo apresentaram pelo menos um gene e / ou integrão associado à resistência a antimicrobianos, o que suporta a hipótese de que as cianobactérias têm capacidade para capturar e disseminar genes de resistência a antibióticos.

De forma a confirmar as hipóteses que surgiram no âmbito deste trabalho, será fundamental continuar este tipo de estudos, abrangendo um número representativo de estirpes de cada espécie e / ou género, isoladas de diferentes *habitats*.

A informação disponível acerca da temática da resistência a antibióticos em cianobactérias ainda é bastante escassa e, em alguns casos, contraditória, o que torna difícil a tarefa de comparar os poucos estudos já realizados. Assim, é fundamental que se proceda ao estabelecimento de metodologias *standard* e de *breakpoints* que permitam definir e interpretar os valores das CIMs das diferentes classes de antibióticos para as cianobactérias.

Apesar de mais estudos serem necessários, os resultados obtidos neste trabalho indicam que, de facto, as cianobactérias podem desempenhar um papel importante no resistoma hídrico. Este conhecimento poderá ajudar a compreender como é que os ecossistemas aquáticos reagem à poluição antibiótica e a definir medidas preventivas ou correctivas no que diz respeito à disseminação da resistência a antibióticos no ambiente.

6. Bibliografia

- Almeida, A., Duarte, S., Nunes, R., Rocha, H., Pena, A., e Meisel, L. (2014). Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal – A Ranking for Ecosurveillance. *Toxics*. 2, 188-225. doi: 10.3390/toxics2020188
- Andersson, M. I., e MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1-11. doi: 10.1093/jac/dkg212
- Antunes, P., Machado, J., e Peixe, L. (2006). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 297-304. doi: 10.1093/jac/dkl242
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., e Peixe, L. (2005). Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 836-839. doi: 10.1128/AAC.49.2.836–839.2005
- Baquero, F., Martínez, J. L., e Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260-265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006
- Bellém, F., Nunes, S., e Morais, M. (2013). Cyanobacteria toxicity: potential public health impact in South Portugal populations. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 76, 263-271. doi: 10.1080/15287394.2013.757204
- Bernardová, K., Babica, P., Maršálek, B., e Bláha, L. (2008). Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. *J. Appl. Toxicol.* 28, 72-77. doi: 10.1002/jat.1257
- Bisht, R., Katiyar, A., Singh, R., e Mittal, P. (2009). Antibiotic resistance – A global issue of concern. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2, 34-39.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., e Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Bockstael, K., e Aerschot A. V. (2009). Antimicrobial resistance in bacteria. *Cent. Eur. J. Med.* 4, 141-155. doi: 10.2478/s11536-008-0088-9
- Bouki, C., Venieri, D., e Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 1-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016
- Bush, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev. Sci. Tech.* 31, 43-56.

Cambau, E., e Guillard, T. (2012). Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev. Sci. Tech.* 31, 77-87.

Cameron, J. C., e Pakrasi, H. B. (2011). Glutathione Facilitates Antibiotic Resistance and Photosystem I Stability during Exposure to Gentamicin in Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3547-3550. doi: 10.1128/AEM.02542-10

Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., e Bartram J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 3, 323-347. doi: 10.1080/109374000436364

Churro, C., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V. C., Bento, A. J., Prabhakar, S., Lobo, A. M., Calado, A. J., e Pereira, P. (2009). Effects of bacillamide and newly synthesized derivatives on the growth of cyanobacteria and microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.* 21, 429-442. doi: 10.1007/s10811-008-9388-3

Churro, C., Dias, E., Paulino, S., Alverca, E., e Pereira, P. (2013). Importância da monitorização de cianobactérias em albufeiras portuguesas. *Observações.* 4, 18-20.

CLSI. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cohen, Y., e Gurevitz, M. (2006). "The cyanobacteria – ecology, physiology and molecular genetics" em *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry, Vol. 4*, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer e E. Stackebrandt. (New York, NY: Springer), 1074-1098.

da Silva, M. F., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O. C., e Manaia, C. M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 166-176. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x

Davies, J., e Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

de Figueiredo, D. R., Reboleira, A. S. S. P., Antunes, S. C., Abrantes, N., Azeiteiro, U., Gonçalves, F., e Pereira, M. J. (2006). The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate lake. *Hydrobiologia.* 568, 145-157. doi: 10.1007/s10750-006-0196-y

Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794, 808-816. doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005

Dias, E., Paulino, S., e Pereira, P. (2015). Cyanotoxins: from poisoning to healing – a possible pathway?. *Limnetica*. 34, 159-172.

Dodd, M. C. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J. Environ. Monit.* 14, 1754-1771. doi: 10.1039/c2em00006g

Džidić, S., Šušković, J., e Kos B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 11-21.

EMA. (2006). Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. Doc ref. EMA/CHMP/SWP/4447/00. European Medicines Evaluation Agency.

EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. EUCAST Discussion Document E.Dis 5.1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

EUCAST. (2014). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 4.0, 2014. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

Frye, J. G., e Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front. Microbiol.* 4:135. doi: 10.3389/fmicb.2013.00135

Furuya, E. Y., e Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 36-45. doi: 10.1038/nrmicro1325

Galvão, H. M., Reis, M. P., Valério, E., Domingues, R. B., Costa, C., Lourenço, D., Condiño, S., Miguel, R., Barbosa, A., Gago, C., Faria, N., Paulino, S., e Pereira, P. (2008). Cyanobacterial blooms in natural waters in southern Portugal: A water management perspective. *Aquat. Microb. Ecol.* 53, 129-140. doi: 10.3354/ame01228

Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., e Stokes, H. W. (2008). The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.* 190, 5095-5100. doi: 10.1128/JB.00152-08

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., e Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Res.* 47, 2050-2064. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.020

Greenwood, D., e Whitley, R. (1997). "Modes of action," em *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*, eds F. O'Grady e H. P. Lambert (New York, NY: Churchill Livingstone), 11-23.

Halling-Sørensen, B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*. 40, 731-739. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00445-2

Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H. C., Andersen, H. R., e Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 53-58. doi: 10.1093/jac/46.suppl_1.53

Hawkey, P. M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, i1-i9. doi: 10.1093/jac/dkn241

Hawkey, P. M., e Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, i3-i10. doi: 10.1093/jac/dkp256

Hoiczky, E., e Hansel, A. (2000). Cyanobacterial Cell Walls: News From an Unusual Prokaryotic Envelope. *J. Bacteriol.* 182, 1191-1199. doi: 10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000

Hong, J. W., Choi, H. G., Kang, S. H., e Yoon, H. S. (2010). Axenic purification and cultivation of an Arctic cyanobacterium, *Nodularia spumigena* KNUA005, with cold tolerance potential for sustainable production of algae-based biofuel. *Algae*. 25, 99-104. doi: 10.4490/algae.2010.25.2.099

INSARJ. (2010). Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

ISO. (2006). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO document 20776-1:2006. International Organization for Standardization.

Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41, 120-126. doi: 10.1086/428052

Jungblut, A. D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D. R., Burns, B. P., e Neilan, B. A. (2005). Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ. Microbiol.* 7, 519-529. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00717.x

Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., e Arai, T. (1999). Characterization of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* isolated from clinical and environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 379-384. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13593.x>

Kim, S., e Aga, D. S. (2007). Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 10, 559-573. doi: 10.1080/15287390600975137

Kolar, B., Arnuš, L., Jeretin, B., Gutmaher, A., Drobne, D., e Durjava, M. K. (2014). The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere.* 115, 75-80. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.049

Komárek, J., e Anagnostidis, K. (1998). "Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales," em *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*, eds H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig e D. Mollenhauer (Elsevier/Spektrum).

Komárek, J., e Anagnostidis, K. (2005). "Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales," em *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*, eds B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz e M. Schagerl (Elsevier/Spektrum).

Komárek, J., e Komárková, J. (2004). Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology.* 4, 1-18.

Kulasooriya, S. A. (2011). Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. *Ceylon J. Sci.* 40, 71-88. doi: 10.4038/cjsbs.v40i2.3925

Kumar, S., e Varela, M. F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Chemotherapy*, 14, 522-534.

Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311-320. doi: 10.1093/jac/dkh325

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere.* 75, 417-434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086

Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech.* 31, 57–64.

LeGresley, M., e McDermott, G. (2010). "Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell," em *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analyses*, eds B. Karlson, C. Cusack, e E. Bresnan (Paris: IOC/UNESCO), 25–27.

Levy, S. B., e Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122-S129. doi: 10.1038/nm1145

Liu, X. Q., e Yang, J. (2004). Bacterial Thymidylate Synthase with Intein, Group II Intron, and Distinctive ThyX Motifs. *J. Bacteriol.* 186, 6316-6319. doi: 10.1128/JB.186.18.6316-6319.2004

Liu, Y., Gao, B., Yue, Q., Guan, Y., Wang, Y., e Huang, L. (2012). Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 77, 79-87. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.10.027

Liu, Y., Zhang, J., e Gao B. (2015). Cellular and Transcriptional Responses in *Microcystis aeruginosa* Exposed to Two Antibiotic Contaminants. *Microb. Ecol.* 69, 535-543. doi: 10.1007/s00248-014-0515-1

López-Rodas, V., Maneiro, E., e Costas, E. (2006). Adaptation of cyanobacteria and microalgae to extreme environmental changes derived from anthropogenic pollution. *Limnetica.* 25, 403-410.

Lorenz, M. G., e Krumbein, W. E. (1984). Large-scale determination of cyanobacterial susceptibility to antibiotics and inorganic ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 422-426. doi: 10.1007/BF00261947

Lützhøft, H. H., Halling-Sørensen, B., e Jørgensen, S. E. (1999). Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 1-6. doi: 10.1007/s002449900435

Marti, E., Variatza, E., e Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 22, 36-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001

Martins, J., Peixe, L., e Vasconcelos, V. (2010). Cyanobacteria and bacteria co-occurrence in a wastewater treatment plant: absence of allelopathic effects. *Water Sci. Technol.* 62, 1954-1962. doi: 10.2166/wst.2010.551

Martins, R. F., Ramos, M. F., Herfindal, L., Sousa, J. A., Skaerven, K., e Vasconcelos, V. M. (2008). Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Mar. Drugs.* 6, 1-11. doi: 10.3390/md6010001

Masoud, M. S., Ali, A. E., e Nasr, N. M. (2014). Chemistry, classification, pharmacokinetics, clinical uses and analysis of beta-lactam antibiotics: A review. *J. Chem. Pharm. Res.* 6, 28-58.

Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893-2902. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.051

Mojica, E. R. E., e Aga, D. S. (2011). "Antibiotics pollution in soil and water: Potential ecological and human health issues," em *Encyclopedia of Environmental Health*, ed J. O. Nriagu (Burlington, VT: Elsevier), 1, 97-110.

Moreira, C., Vasconcelos, V., e Antunes, A. (2013). Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. *Mar. Drugs*. 11, 4350-4369. doi: 10.3390/md11114350

Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., e Correia, A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1243-1250. doi: 10.1093/jac/dkm340

Mulling, B. T. M., Wood, S. A., e Hamilton, D. P. (2014). Intra-colony motility of *Microcystis wesenbergii* cells. *New Zeal. J. Bot.* 52, 153-159. doi: 10.1080/0028825X.2013.861856

Mur, L. R., Skulberg, O. M., e Utkilen, H. (1999). "Cyanobacteria in the environment," em *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, eds I. Chorus e J. Bartram (London: WHO, E & FN Spon), 15-40.

Myllykallio, H., Leduc, D., Filee, J., e Liebl, U. (2003). Life without dihydrofolate reductase FoaA. *Trends Microbiol.* 11, 220-223. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00101-X

NIAID. (2006). The Problem of Antimicrobial Resistance. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

Padmapriya, V., e Anand, N. (2010). Evaluation of some industrially important enzymes in filamentous Cyanobacteria. *ARPN J. Ag. & Bio. Sci.* 5, 86-97.

Pan, X., Deng, C., Zhang, D., Wang, J., Mu, G., e Chen, Y. (2008). Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquat. Toxicol.* 89, 207-213. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.06.018

Paulino, S., Sam-Bento, F., Churro, C., Alverca, E., Dias, E., Valério, E., e Pereira, P. (2009). The Estela Sousa e Silva Algal Culture Collection: a resource of biological and toxicological interest. *Hydrobiologia.* 636, 489-492. doi: 10.1007/s10750-009-9977-4

Prasanna, R., Madhan, K., Singh, R. N., Chauhan, A. K., e Nain, L. (2010). Developing biochemical and molecular markers for cyanobacterial inoculants. *Folia Microbiol.* 55, 474-480. doi: 10.1007/s12223-010-0079-5

Reynaud, P. A., e Franche, C. (1986). Isolation and characterization of nonheterocystous tropical cyanobacteria growing on nitrogen-free medium. *MIRCEN J.* 2, 427-443. doi: 10.1007/BF00933366

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., e Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345-360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032

Shi, T., e Falkowski, P. G. (2008). Genome evolution in cyanobacteria: The stable core and the variable shell. *PNAS.* 105, 2510-2515. doi: 10.1073/pnas.0711165105

Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K., e Mohapatra, T. M. (2011). Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J. Antibiot.* 64, 401-412. doi: 10.1038/ja.2011.21

Skulberg, R., e Skulberg, O. M. (1990). *Forskning Med Algekulturer NIVAs Kultursamling av Alger.* Norway: NIVA.

Snyder, D. S., Brahmsha, B., Azadi, P., e Palenik B. (2009). Structure of Compositionally Simple Lipopolysaccharide from Marine *Synechococcus*. *J. Bacteriol.* 191, 5499-5509. doi: 10.1128/JB.00121-09

Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y., e Day, J. G. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1577-1595. doi: 10.1099/ijls.0.01834-0

Svircev, Z., Krstic, S., Miladinov-Mikov, M., Baltic, V., e Vidovic, M. (2009). Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27, 36-55. doi: 10.1080/10590500802668016

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.* 34, S3-S10. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.219

Tooming-Klunderud, A., Sogge, H., Rounge, T. B., Nederbragt, A. J., Lagesen, K., Glöckner, G., Hayes, P. K., Rohrlack, T., e Jakobsen, K. S. (2013). From Green to Red: Horizontal Gene Transfer of the Phycoerythrin Gene Cluster Between *Planktothrix* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6803-6812. doi: 10.1128/AEM.01455-13

Urbach, C., Fastrez, J., e Soumillion, P. (2008). A New Family of Cyanobacterial Penicillin-binding Proteins. A missing link in the evolution of class A beta-lactamases. *J. Biol. Chem.* 283, 32516-32526. doi: 10.1074/jbc.M805375200

Usha, P. T. A., Sabitha, J., e Nisha A. R. (2010). Antimicrobial Drug Resistance – A global concern. *Vet. World*. 3, 138-139.

Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., e Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*. 155, 642-656. doi: 10.1099/mic.0.022848-0

van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., e Bakker, G. J. I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res*. 51, 7-60. doi: 10.1002/mnfr.200600185

van der Grinten, E., Pikkemaat, M. G., van den Brandhof, E. J., Stroomberg, G. J., e Kraak, M. H. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. 80, 1-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.011

Vázquez-Martínez, G., Rodríguez, M. H., Hernández-Hernández, F., e Ibarra, J. E. (2004). Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. *J. Microbiol. Methods*. 57, 115-121. doi: 10.1016/j.mimet.2003.12.003

Vincent, W. F. (2009). "Protists, Bacteria and Fungi: Planktonic and Attached | Cyanobacteria," em *Plankton of Inland Waters*, ed. G. E. Likens (Elsevier), 226-232.

Wiktelius, E., e Stenberg, G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J*. 406, 115-123. doi: 10.1042/BJ20070328

WHO. (2010). Global Salm-Surv: A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. World Health Organization.

Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biol*. 8, 123-128. doi: 10.1186/1741-7007-8-123

Zhang, X. X., Zhang, T., e Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 82, 397-414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z

Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., e Papke, R. T. (2006). Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res*. 16, 1099-1108. doi: 10.1101/gr.5322306

7. Anexos

7.1. Anexo I – Composição do meio de cultura Z8 (Skulberg e Skulberg, 1990)

Tabela 1 | Composição do meio de cultura Z8.

Solução stock	Quantidade
Solução A	10 mL/L de água bidestilada
Solução B	10 mL/L de água bidestilada
Solução Fe-EDTA	10 mL/L de água bidestilada
Solução de micronutrientes	1 mL/L de água bidestilada

Tabela 2 | Composição da solução A.

Componente	Quantidade
NaNO ₃	46,7 g/L água bidestilada
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	5,9 g/L água bidestilada
MgSO ₄ •7H ₂ O	2,5 g/L água bidestilada

Tabela 3 | Composição da solução B.

Componente	Quantidade
K ₂ HPO ₄	3,1 g/L água bidestilada
Na ₂ CO ₃	2,1 g/L água bidestilada

Tabela 4 | Composição da solução Fe-EDTA.

Solução	Composição	Quantidade
FeCl ₃	2,8 g FeCl ₃ •6H ₂ O dissolvidos em 100 mL de HCL 0,1M / L água bidestilada	10 mL
EDTA	3,9 g EDTA-Na ₂ dissolvidos em 100 mL de NaOH 0,1M / L água bidestilada	9,5 mL

Tabela 5 | Composição da solução de micronutrientes.

Componente	Quantidade
H ₃ BO ₃	0,31000 g/L água bidestilada
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,02870 g/L água bidestilada
MnSO ₄	0,22300 g/L água bidestilada
Na ₂ WO ₄ •2H ₂ O	0,00330 g/L água bidestilada
V ₂ O ₅	0,00089 g/L água bidestilada
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0,01460 g/L água bidestilada
Cr(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,04100 g/L água bidestilada
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0,00880 g/L água bidestilada
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ •24H ₂ O	0,04740 g/L água bidestilada
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O	0,01980 g/L água bidestilada
KI	0,00830 g/L água bidestilada
KBr	0,01200 g/L água bidestilada
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,01250 g/L água bidestilada
Cd(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	0,01550 g/L água bidestilada

7.2. Anexo II – Fotografias das microplacas contendo as culturas cianobacterianas expostas aos antibióticos

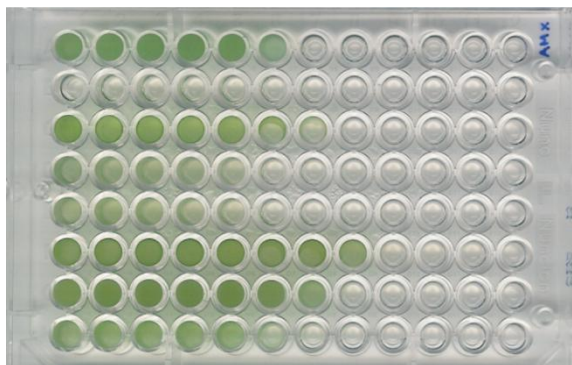


Figura 1 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à amoxicilina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

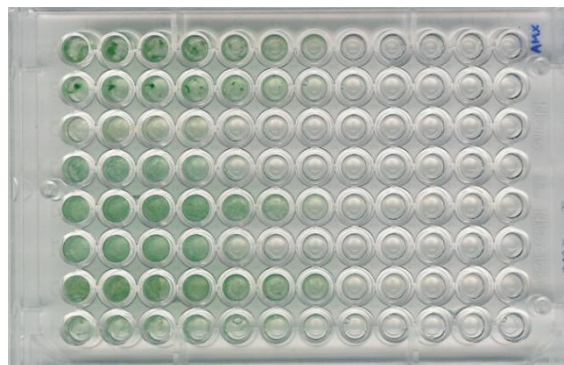


Figura 2 | Culturas de *P. agardhii* expostas à amoxicilina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

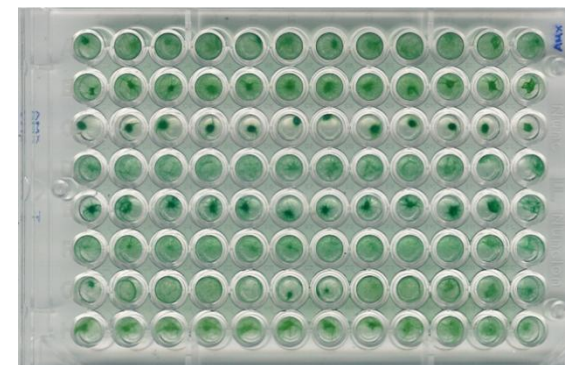


Figura 3 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à amoxicilina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

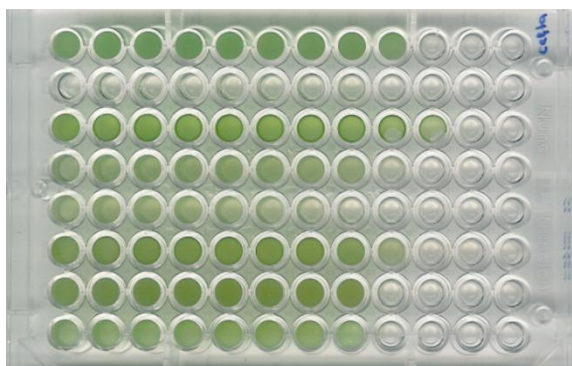


Figura 4 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à ceftazidima.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

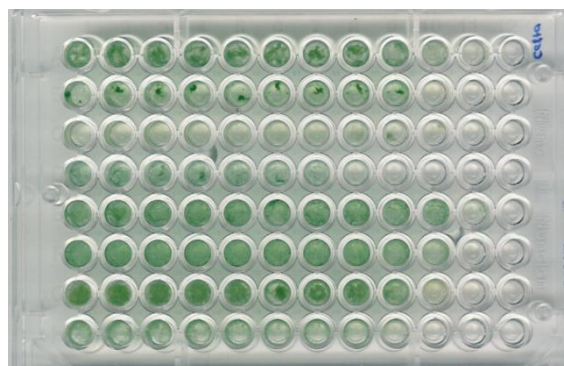


Figura 5 | Culturas de *P. agardhii* expostas à ceftazidima.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

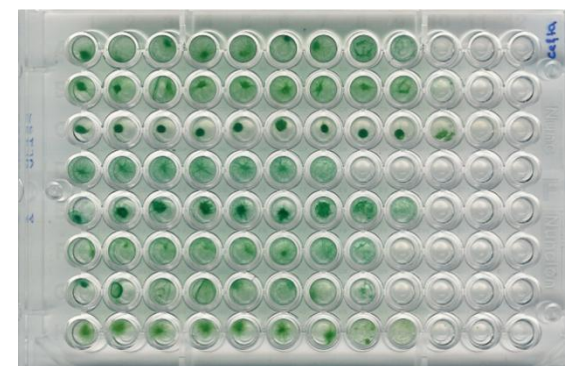


Figura 6 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à ceftazidima.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

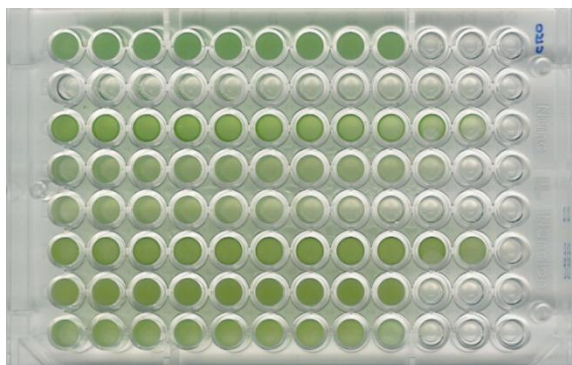


Figura 7 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à ceftriaxona.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

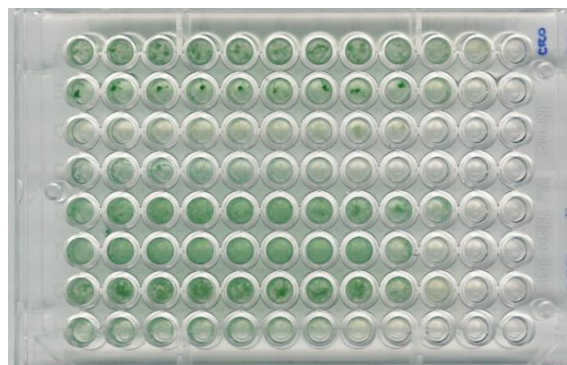


Figura 8 | Culturas de *P. agardhii* expostas à ceftriaxona.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

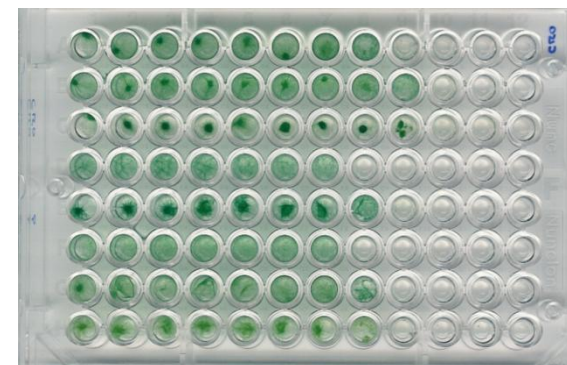


Figura 9 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à ceftriaxona.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

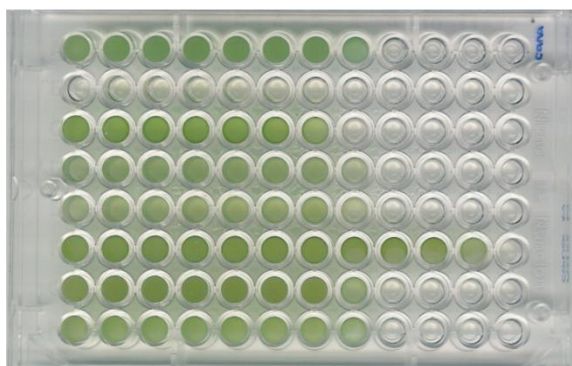


Figura 10 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à canamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).



Figura 11 | Culturas de *P. agardhii* expostas à canamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

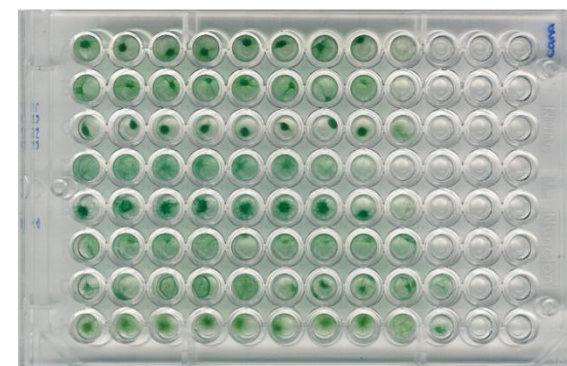


Figura 12 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à canamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

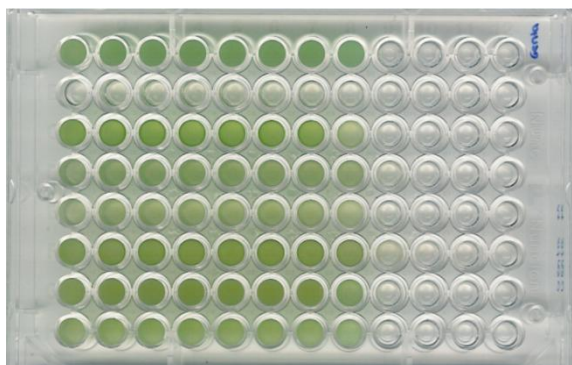


Figura 13 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à gentamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

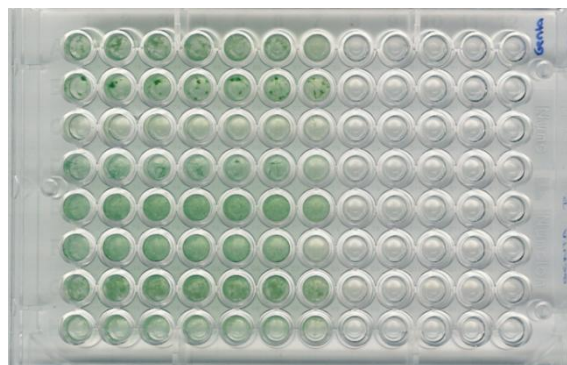


Figura 14 | Culturas de *P. agardhii* expostas à gentamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

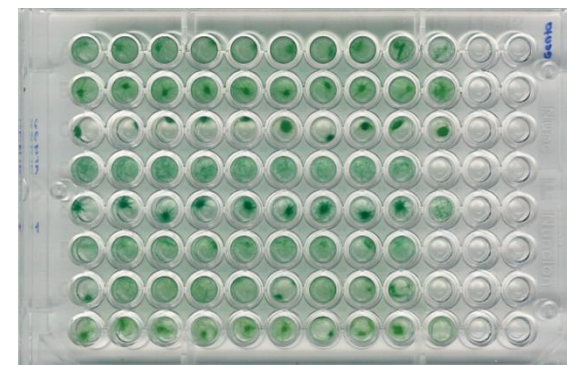


Figura 15 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à gentamicina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

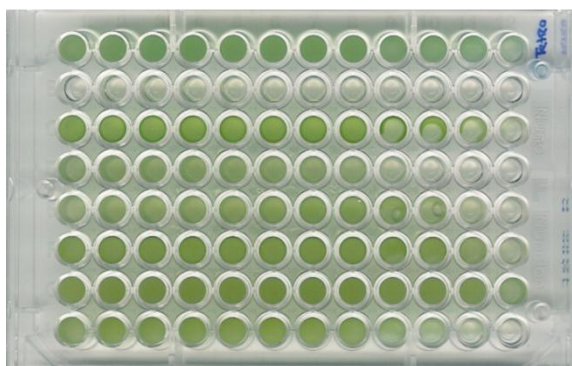


Figura 16 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à tetraciclina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

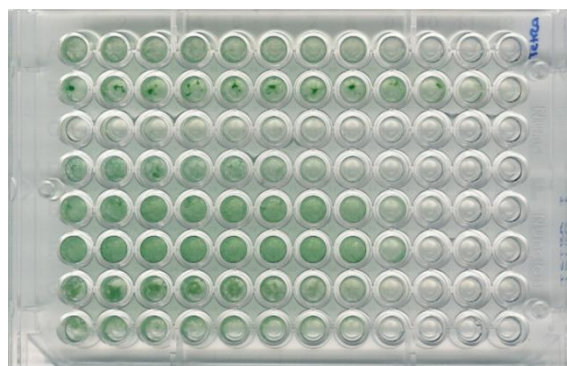


Figura 17 | Culturas de *P. agardhii* expostas à tetraciclina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

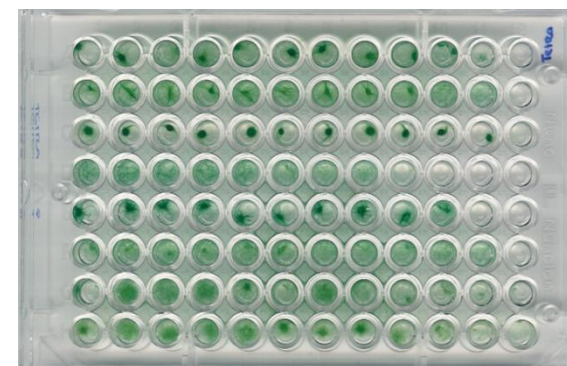


Figura 18 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à tetraciclina.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

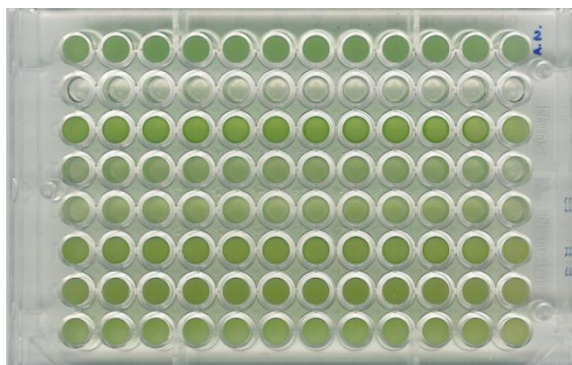


Figura 19 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas ao ácido nalidíxico. (Fotografia de Micaela Oliveira).

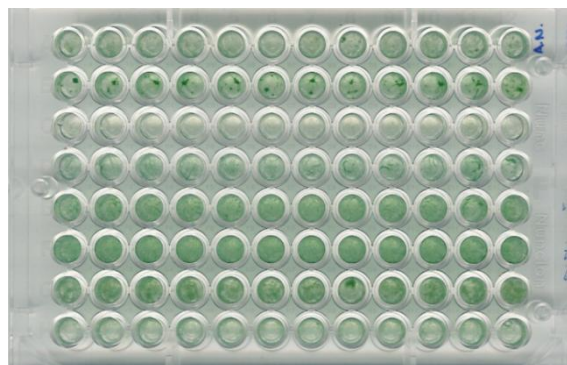


Figura 20 | Culturas de *P. agardhii* expostas ao ácido nalidíxico. (Fotografia de Micaela Oliveira).

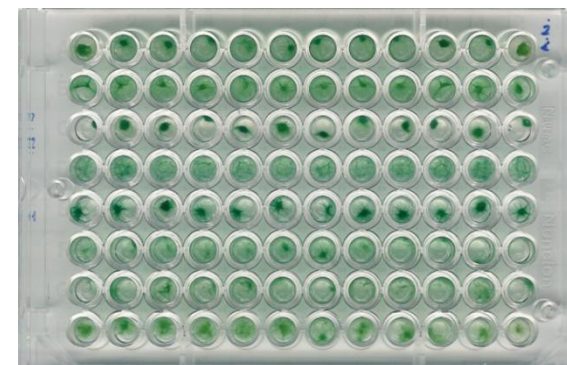


Figura 21 | Culturas de *P. mougeotii* expostas ao ácido nalidíxico. (Fotografia de Micaela Oliveira).

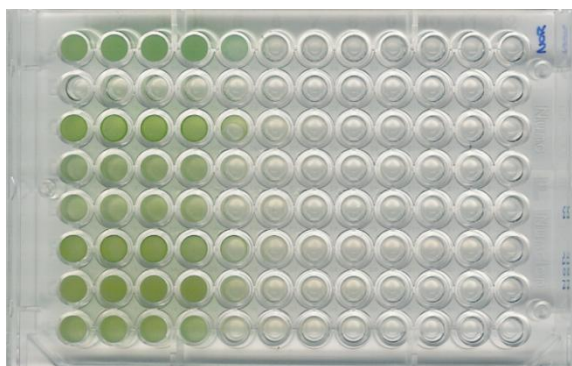


Figura 22 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas à norfloxacina. (Fotografia de Micaela Oliveira).

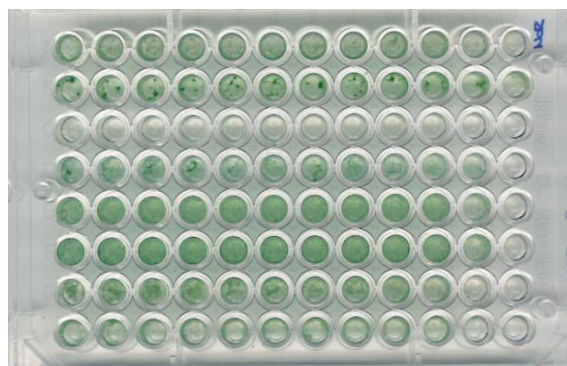


Figura 23 | Culturas de *P. agardhii* expostas à norfloxacina. (Fotografia de Micaela Oliveira).

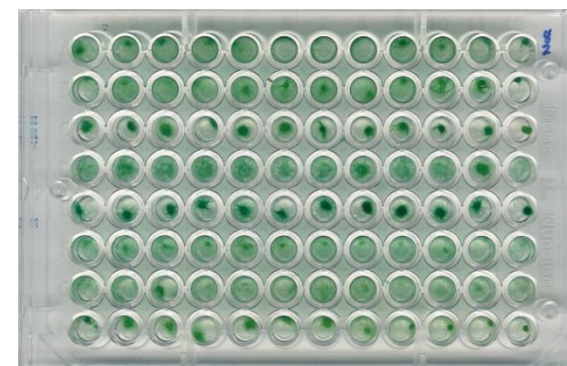


Figura 24 | Culturas de *P. mougeotii* expostas à norfloxacina. (Fotografia de Micaela Oliveira).

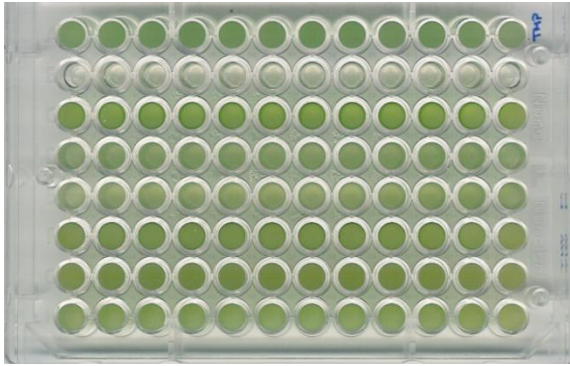


Figura 25 | Culturas de *M. aeruginosa* expostas ao trimetoprim.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

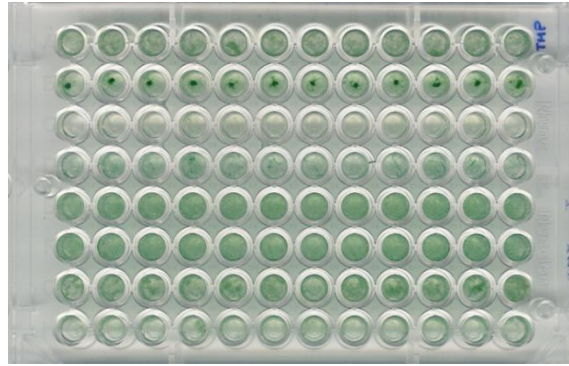


Figura 26 | Culturas de *P. agardhii* expostas ao trimetoprim.
(Fotografia de Micaela Oliveira).

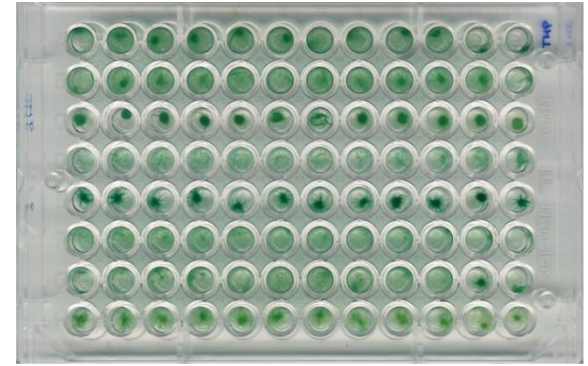


Figura 27 | Culturas de *P. mougeotii* expostas ao trimetoprim.
(Fotografia de Micaela Oliveira).