

UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



# **Deteção do potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares**

RITA ISABEL PEREIRA CORDEIRO

Ponta Delgada, outubro de 2015

UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



# **Deteção do potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares**

RITA ISABEL PEREIRA CORDEIRO

Dissertação apresentada à  
Universidade dos Açores para  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biomédicas.

Orientadores:  
Prof. Doutora Maria Amélia Oliveira Gonçalves Fonseca  
Prof. Doutor Vítor Manuel da Costa Gonçalves

Ponta Delgada, outubro de 2015



*“Por mais que se avance em cada ciência, chega-se a um ponto onde ou se tem de decretar arbitrariamente que além de ali se não quer ir, ou de parar de cansaço, tão de inexplicável em inexplicável se vai - e em qualquer dos casos fica, quer queiramos quer não, o vago para além do ponto onde, cansados ou teimosos, parámos.”*

Fernando Pessoa



No decorrer desta tese publicou-se o seguinte trabalho:

Cordeiro, R.; Luz, R.; Gonçalves, V. & Fonseca, A. (2015). Detecção do potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares. Comunicação oral no *4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas*, Lisboa, 32.

## AGRADECIMENTOS

Para a realização, desenvolvimento e conclusão desta tese de mestrado dependi de diversas pessoas, de modos diferentes. Queria começar por agradecer aos meus orientadores, à Prof. Doutora Amélia Fonseca e ao Prof. Doutor Vítor Gonçalves, por me terem aceitado como orientanda, por todo o conhecimento, tempo e paciência disponibilizados e essencialmente por todo o apoio e empenho prestados neste percurso.

Um muito obrigado à Universidade dos Açores e, mais especificamente, ao Departamento de Biologia por me aceitar como aluna.

Ao Rodolfo Santos, do laboratório de genética sistemática, por todo o auxílio prestado e por toda a paciência em esclarecer dúvidas, obrigado.

A todos os técnicos do Departamento de Biologia que auxiliaram esta tese de algum modo, um obrigado.

Aos meus colegas de mestrado especialmente à Ana Rosa Melo, Ângela Vieira, Telmo Eleutério e Tiago Menezes, um obrigado pelos desabafos em comum.

A todos os meus amigos que me apoiaram durante este período de trabalho, em especial à Ana Rosa Melo, Carla Raposo e à M<sup>a</sup> Carolina Silva, um muito obrigado pela vossa amizade.

Ao Rúben, o maior obrigado, a quem devo muito a concretização desta tese, obrigada pelo imenso apoio laboratorial e por todo o carinho e apoio incondicional.

À minha mãe obrigada por tudo, pelo constante apoio e motivação e aos meus irmãos, obrigada pelas brincadeiras e apoio emocional nesta fase.

De modo geral agradeço com grande apreciação a todos os que estiveram presentes neste período.

## ÍNDICE GERAL

Índice de figuras .....	9
Índice de tabelas .....	11
Lista de abreviaturas .....	13
Lista de códigos de lagoas .....	14
Resumo .....	15
Abstract.....	16
1. Introdução.....	17
1.1. Enquadramento e Objetivos.....	17
1.2. Cianobactérias.....	20
1.2.1. Metabolismo e Ecologia .....	20
1.2.2. Morfologia e Taxonomia .....	22
1.3. Cianotoxinas .....	25
1.3.1. Hepatotoxinas .....	28
1.3.1.1. Microcistinas .....	28
1.3.1.2 Nodularinas .....	33
1.3.2. Neurotoxinas.....	35
1.3.2.1. Anatoxinas.....	35
1.3.2.2. Saxitoxinas .....	38
1.3.3. Citotoxinas.....	42
1.3.3.1. Cilindrospermopsinas.....	42
2. Material e Métodos .....	44
2.1. Planificação Geral.....	44
2.2. Área de Estudo.....	44
2.3. Amostragens .....	45
2.4. Análise Físico-Química .....	46
2.4.1. Parâmetros físico-químicos das lagoas .....	46
2.4.2. Quantificação de clorofila <i>a</i> .....	47
2.5. Isolamento, cultura e identificação de cianobactérias .....	47
2.5.1. Isolamento em agar.....	47
2.5.2. Isolamento em microscopia invertida.....	48
2.6. Análise molecular .....	48
2.6.1. Extração e quantificação de DNA .....	48



2.6.2. Amplificação por PCR do gene produtor de ficocianina.....	49
2.6.3. Amplificação por PCR dos genes produtores de cianotoxinas .....	50
3. Resultados.....	52
3.1. Parâmetros físico-químicos.....	52
3.2. Ocorrência, isolamento e cultura de cianobactérias.....	52
3.3. Análise molecular .....	55
3.3.1. Testes de métodos de extração de DNA .....	55
3.3.2. Detecção dos genes de ficocianinas e cianotoxinas nas amostras mensais	56
3.3.3. Detecção dos genes de ficocianinas e cianotoxinas nos isolados.....	59
4. Discussão .....	61
4.1. Otimização e escolha de métodos de extração.....	61
4.2. Ocorrência, isolamento e cultura de cianobactérias.....	62
4.3. Detecção dos genes de ficocianinas e cianotoxinas.....	64
4.3.1. Amostras Ambientais.....	64
4.3.2. Isolados .....	67
4.4. Relação entre a presença de genes produtores de cianotoxinas e as variáveis ambientais .....	67
5. Considerações Finais .....	70
6. Bibliografia.....	73
Anexo I.....	i
Anexo II.....	ii
Anexo III .....	iii
Anexo IV .....	vi
Anexo V.....	viii
Anexo VI.....	x

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografias de espécies de cianobactérias observadas. <b>A:</b> <i>Anabaena sp.</i> ; <b>B:</b> <i>Microcystis flos-aquae</i> ; <b>C:</b> <i>Woronichinia naegeliana</i> ; <b>D:</b> <i>Aphanizomenon sp.</i> ; <b>E:</b> <i>Oscillatoria tenuis</i> ; <b>F:</b> <i>Aphanothece sp.</i> .....	23
<b>Figura 2.</b> Estrutura química de microcistina (Fristachi & Sinclair, 2008). .....	31
<b>Figura 3.</b> Esquema estrutural da organização do gene <i>cluster</i> produtor de microcistinas em diferentes espécies produtoras (Kurmayer & Christiansen, 2009). .....	32
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo da ação das microcistinas (adaptado de Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). <b>A:</b> situação normal; <b>B:</b> intoxicação .....	33
<b>Figura 5.</b> Estrutura química de nodularinas (Gehring <i>et al.</i> , 2012). .....	34
<b>Figura 6.</b> Esquema estrutural da organização do gene <i>cluster ndaS</i> (Neilan <i>et al.</i> , 2008). .....	34
<b>Figura 7.</b> Estrutura química de anatoxinas (adaptado de Sarma, 2013). <b>A:</b> anatoxina-a; <b>B:</b> homoanatoxina-a; <b>C:</b> anatoxina-a(s).....	36
<b>Figura 8.</b> Esquema do gene <i>cluster</i> responsável pela biossíntese de anatoxina-a e homoanatoxina-a (adaptado de Méjean <i>et al.</i> , 2009).....	36
<b>Figura 9.</b> Modo de ação da anatoxina-a (adaptado de Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). <b>A:</b> situação normal; <b>B:</b> intoxicação. ....	37
<b>Figura 10.</b> Modo de ação da anatoxina-a(s) (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).....	38
<b>Figura 11.</b> Estrutura química geral da saxitoxina, <b>R</b> representa as posições variáveis (Sarma, 2013). .....	39
<b>Figura 12.</b> Estrutura do gene <i>cluster stx</i> em <i>C. raciborskii</i> T3 (Kellmann <i>et al.</i> , 2008). .....	40
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de ação da saxitoxina nos canais de sódio (Zaccaroni & Scaravelli, 2008b). <b>A:</b> situação normal; <b>B:</b> intoxicação.....	41
<b>Figura 14.</b> Estrutura química da cilindrospermopsina (1) e das suas variantes 7-deoxi-cilindrospermopsina (2) e 7-epicilindrospermopsina (3) (Moreira <i>et al.</i> , 2012). .....	42
<b>Figura 15.</b> Organização de <i>aoaA</i> , <i>aoaB</i> , <i>aoaC</i> em <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> (Neilan <i>et al.</i> , 2008).....	43
<b>Figura 16.</b> Organização do gene <i>cluster cyr</i> em <i>C. raciborskii</i> (Moreira <i>et al.</i> , 2012). <i>cyrA</i> : amidinotransferase; <i>cyrD</i> , <i>cyrF</i> , <i>cyrB</i> , <i>cyrE</i> , <i>cyrC</i> : PKS/NRPS; <i>cyrG</i> , <i>cyrH</i> : anel	

de uracilos; *cyrI*, *cyrJ*, *cyrN*: *tailoring enzymes*; *cyrK*: *transporte*; *cyrO*: *regulação*; *cyrL*, *cyrM*: *transposases*. ..... 43

**Figura 17.** Mapa da ilha de São Miguel indicando a localização das lagoas estudadas. (A) RS(Mi); (B) ST(Mi); (C) CN(Mi); (D) A(Mi); (E) V(Mi); (F) EN(Mi); (G) ES(Mi); (H) R(Mi); (I) FG(Mi); (J) FN(Mi); (K) SB(Mi); (L) CG(Mi); (M) AR(Mi); (N) PDR(Mi). ..... 45

**Figura 18.** Fotografias de espécies de cianobactérias isoladas. **A:** *Microcystis flos-aquae* de FN(Mi); **B:** *Pseudanabaena sp.* de R(Mi); **C:** *Planktolyngbya sp.* de FN(Mi); **D:** *Pseudanabaena sp.* de A(Mi). ..... 54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação taxonômica da classe <i>Cyanophyceae</i> (Komárek <i>et al.</i> , 2014). 24	24
<b>Tabela 2.</b> Classificação de cianotoxinas, LD <sub>50</sub> , gêneros produtores e mecanismos de ação (Carmichael & Li 2006; Chorus <i>et al.</i> , 2000; Kaebernick & Neilan, 2001; Sarma, 2013; Wiegand & Pflugmacher, 2005)..... 27	27
<b>Tabela 3.</b> Listagem de cianobactérias descritas, na literatura, como produtoras de cianotoxinas. .... 29	29
<b>Tabela 4.</b> Resumo das características das lagoas estudadas (Gonçalves, 2008; Pereira <i>et al.</i> , 2014; SRAM, 2013). <b>PDL:</b> Ponta Delgada; <b>PV:</b> Povoação; <b>RG:</b> Ribeira Grande; <b>VFC:</b> Vila Franca do Campo. .... 46	46
<b>Tabela 5.</b> Composição do <i>mix</i> de reação para o par de <i>primer cpcB-A</i> (Neilan <i>et al.</i> , 1995) ..... 49	49
<b>Tabela 6.</b> Pares de <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes produtores de microcistina. .... 50	50
<b>Tabela 7.</b> Composição do <i>mix</i> de reação para os pares de <i>primers</i> MSF/MSR, 2156-F/3111-R, PSCF1/PSCR1, PKDF1/PKDR1, PKDF2/PKDR2, PKEF1/PKER1, PKGF1/PKGR1 (Ouahid <i>et al.</i> , 2005)..... 51	51
<b>Tabela 8.</b> Pares de <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes produtores de saxitoxina e anatoxina-a..... 51	51
<b>Tabela 9.</b> Composição do <i>mix</i> de reação para os pares de <i>primers stxAF/stxAR</i> e <i>anaC-genF/anaC-genR</i> (Ledreux <i>et al.</i> , 2010; Rantala-Ylinen <i>et al.</i> , 2011)..... 51	51
<b>Tabela 10.</b> Valores médios para os parâmetros físico-químicos registados nas amostragens mensais. .... 52	52
<b>Tabela 11.</b> Listagem de cianobactérias observadas e isoladas a partir de amostras ambientais de lagoas da ilha de São Miguel..... 53	53
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos após extração com o protocolo CTAB. -: sem amplificação; +: gene amplificado. .... 55	55
<b>Tabela 13.</b> Resultados da extração de DNA com o kit <i>PureLink™ Plant</i> . -: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada..... 55	55
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos com o kit <i>DNeasy®Plant</i> . -: sem amplificação; +: gene amplificado. .... 56	56

<b>Tabela 15.</b> Resultados obtidos com o protocolo adaptado de Singh <i>et al.</i> (2011). -: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada.....	56
<b>Tabela 16.</b> Resultados após extração de DNA das amostras colhidas mensalmente: quantificação e determinação da qualidade do DNA extraído; amplificação do par de <i>primer cpcB-A</i> . -: sem amplificação; +: gene amplificado. ....	56
<b>Tabela 17.</b> Amplificação dos genes produtores de microcistina. -: sem amplificação; +: gene amplificado.....	58
<b>Tabela 18.</b> Amplificação dos genes produtores de neurotoxinas. -: sem amplificação; +: gene amplificado.....	59
<b>Tabela 19.</b> Resultados da amplificação do gene produtor de ficocianinas nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação do gene; +: gene amplificado. ....	59
<b>Tabela 20.</b> Resultados da amplificação dos genes produtores de microcistina nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação do gene. ....	60
<b>Tabela 21.</b> Resultados da amplificação dos genes produtores de neurotoxinas nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação; +: gene amplificado.....	60
<b>Tabela 22.</b> Quantificação de DNA e valores médios para os protocolos testados. ....	62
<b>Tabela 23.</b> Totalidade dos resultados de análise molecular e físico-química das lagoas amostradas.-: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada; a: parâmetro não registrado.....	x
<b>Tabela 24.</b> Dados ambientais registrados <i>in situ</i> no momento da amostragem. ....	xiii

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Adda** - Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-decafenil-4,6-dienóico/ *3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4-6-dienoic acid*

**ATX-a** - Anatoxina-a/ *anatoxin-a*

**ATX-a(s)** - Anatoxina-a(s)/ *anatoxin-a(s)*

**atm** - Atmosfera/ *atmosphere*

**bp** - Pares de bases/ *base pairs*

**CTAB** - *Cetyltrimethylammonium bromide*

**CYN** - Cilindrospermopsina/ *cylindrospermopsin*

**Chl-a** - Clorofila a/ *chlorophyll a*

**Cond** - Condutividade/ *conductivity*

**Da** - Dalton

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico/ *deoxyribonucleic acid*

**HBAs** - *Harmful algal blooms*

**HMAN** - Homoanatoxina-a/ *homoanatoxin-a*

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência/ *high-performance liquid chromatography*

**MC** - Microcistina/ *microcystin*

**MC-LR** - Microcistina-LR/ *microcystin-LR*

**NOD** - Nodularina/ *nodularin*

**NRPS** - Sintetases de péptidos não ribossomais/ *nonribosomal peptide synthetases*

**OFRs** - *Open reading frames*

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase/ *polymerase chain reaction*

**PKS** - Sintases de policetídeos/ *polyketide synthases*

**PSPs** - *Paralytic shellfish poisonings*

**PSTs** - *Paralytic shellfish toxins*

**RNA** - Ácido ribonucleico/ *ribonucleic acid*

**rpm** - Revoluções por minuto/ *revolutions per minute*

**SRAM** - Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Governo dos Açores/ *Azores Government Environmental Secretary*

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio/ *sodium dodecyl sulfate*

**STX** - Saxitoxina/ *saxitoxin*

**Temp** - Temperatura/ *temperature*

## LISTA DE CÓDIGOS DE LAGOAS

<b>AR(Mi)</b>	Lagoa do Areeiro
<b>A(Mi)</b>	Lagoa Azul (Sete Cidades)
<b>CN(Mi)</b>	Lagoa do Canário
<b>CG(Mi)</b>	Lagoa do Congro
<b>EN(Mi)</b>	Lagoa das Empadadas Norte
<b>ES(Mi)</b>	Lagoa das Empadadas Sul
<b>FG(Mi)</b>	Lagoa do Fogo
<b>FN(Mi)</b>	Lagoa das Furnas
<b>PDR(Mi)</b>	Lagoa do Pico D'el Rei
<b>R(Mi)</b>	Lagoa Rasa da Serra Devassa
<b>RS(Mi)</b>	Lagoa Rasa das Sete Cidades
<b>ST(Mi)</b>	Lagoa de Santiago
<b>SB(Mi)</b>	Lagoa de São Brás
<b>V(Mi)</b>	Lagoa Verde (Sete Cidades)

## RESUMO

Nas últimas décadas a densidade de cianobactérias e a frequência dos seus *blooms* nas lagoas dos Açores registou um aumento significativo. Reconhecendo a importância das cianobactérias e suas toxinas, foi implementado um programa de monitorização das lagoas do arquipélago em que é determinada a concentração de microcistinas por métodos analíticos estandardizados (HPLC). Contudo, as espécies dominantes (e.g. várias espécies dos géneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon*) são capazes de produzir outras toxinas para além das microcistinas, nomeadamente saxitoxina e anatoxina-a.

Com o objetivo de detetar o potencial de produção de saxitoxina, anatoxina-a e microcistina nas lagoas da ilha de São Miguel (Açores), colheram-se amostras mensais de 14 lagoas, analisando-se a presença de cianobactérias (gene produtor da ficocianina: PC-IGS) e de genes produtores de saxitoxina (*stxA*), anatoxina-a (*anaC*) e microcistina (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*), através de técnicas moleculares (PCR). Simultaneamente procedeu-se ao isolamento e cultivo de espécimes presentes nestas amostras para avaliar a distribuição destes genes nas espécies existentes.

Foi possível observar e classificar 16 diferentes espécies de cianobactérias, das quais três foram obtidas em cultura pura: *Pseudanabaena* sp., *Microcystis flos-aquae* e *Planktolyngbya* sp. O gene *stxA* foi detetado em amostras de *Microcystis flos-aquae* e *Planktolyngbya* sp.

Das 63 amostras estudadas foi detetado o gene produtor da ficocianina em 19 (36,7%), os genes produtores de microcistina e de saxitoxina foram detetados em oito e em quatro destas 19 amostras, respetivamente. O gene *anaC* não foi detetado em qualquer amostra. Com os resultados obtidos pode-se afirmar que existe potencial cianotóxico em amostras pertencentes a quatro diferentes lagoas: Lagoa Azul, Lagoa Verde, Lagoa de Santiago e Lagoa das Furnas. Estes resultados mostram que existe um potencial de produção não apenas de microcistina, mas também de saxitoxina.

Face a estes resultados, recomenda-se um estudo mais exaustivo da presença de genes produtores de cianotoxinas em lagoas dos Açores e futuramente a inclusão das metodologias moleculares em sistemas de alerta de risco para a saúde pública.

**Palavras-Chave:** Cianobactérias, Cianotoxinas, PCR, Saúde Pública, Açores.



## ABSTRACT

In recent decades the density of cyanobacteria and the frequency of their blooms in lakes of the Azores islands have been increasing significantly. The recognition of the cyanobacteria importance and their toxins in surface waters, lead to the implementation of a program for the archipelago lakes monitoring, in which it is determined the concentration of microcystins by standardized analytical methods (HPLC). However, the dominant cyanobacteria species (e.g. several species of the genera *Microcystis*, *Anabaena* and *Aphanizomenon*) are capable of producing other toxins in addition to microcystin, notably saxitoxin and anatoxin-a.

With the aim to detect the potential for production of saxitoxins, anatoxin and microcystins in fresh waters on the island of São Miguel (Azores), samples were collected monthly from 14 lakes, analyzing the presence of cyanobacteria (phycocyanin gene: PC-IGS), saxitoxin (*stxA*), anatoxin-a (*anaC*) and microcystin genes (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* and *mcyG*), through molecular techniques (PCR). Simultaneously the isolation and cultivation of specimens present in these samples was made to assess the distribution of these genes in existing species.

It was possible to observe and classify 16 different cyanobacteria species, three of these species were obtained in pure culture: *Pseudanabaena sp.*, *Microcystis flos-aquae* and *Planktolyngbya sp.* The *stxA* gene was detected in *Microcystis flos-aquae* e *Planktolyngbya sp.* samples.

Of the 63 samples studied the phycocyanin gene was detected in 19 (36.7%), the microcystin and saxitoxin genes were detected in eight and in four of these 19 samples, respectively. The *anaC* gene was not detected in any sample. With these results, it can be stated that there is cyanotoxic potential in samples belonging to four different lakes: Lagoa Azul, Lagoa Verde, Lagoa de Santiago and Lagoa das Furnas. These findings show that there is a potential for production of not only microcystin, but also saxitoxin.

In view of these results, it is recommended a more comprehensive study of the presence of cyanotoxins producing genes in the Azores lakes and in the future the inclusion of molecular methodologies in warning systems for risk to public health arising.

**Key-words:** Cyanobacteria, Cyanotoxins, PCR, Public Health, Azores.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

Segundo Porteiro (2000) os Açores possuem 88 lagoas distribuídas por cinco das nove ilhas: São Miguel, Terceira, Pico, Flores e Corvo.

Em São Miguel está cerca de 93% do volume total de água armazenado em massas lagunares dos Açores, sendo que somente as lagoas Verde, Azul e das Furnas representam quase metade destas águas ocupando um volume total de  $57,6 \times 10^6 \text{ km}^3$  (Gonçalves, 2008; Porteiro, 2000). As lagoas da ilha das Flores representam cerca de 5% do volume das águas lacustres do arquipélago, enquanto as das ilhas da Terceira, Pico e Corvo cerca de 2% (Porteiro, 2000).

A eutrofização de muitas destas massas lagunares é um problema que afeta gravemente a qualidade da água (Santos *et al.*, 2004; SRAM, 2011). A entrada de fertilizantes e matéria orgânica provenientes de atividades humanas provocam, entre outros, o aumento da biomassa fitoplanctónica e alterações na estrutura desta comunidade, nomeadamente a formação de *blooms* de cianobactérias (Cymbron *et al.*, 2005, 2008; Santos *et al.*, 2004). As cianobactérias são conhecidas por produzirem toxinas que são uma ameaça não só à saúde ambiental como à saúde pública (Chorus *et al.*, 2000; Kurmayer & Christiansen, 2009; Sarma, 2013).

Como consequência da degradação do estado das lagoas, a Secretaria Regional do Ambiente e do Mar do Governo Regional dos Açores (SRAM), mais propriamente a Direção Regional do Ordenamento do Território e dos Recursos Hídricos viu a necessidade de monitorizar a qualidade e investigar a presença de cianotoxinas nestas massas de água, de modo a proteger a saúde pública dos utilizadores destas águas, quer para fins recreativos quer para consumo, bem como proteger o valor paisagístico destas lagoas e melhorar a qualidade das águas (Cymbron *et al.*, 2005, 2008; Pacheco *et al.*, 2004; SRAM, 2011).

Os trabalhos resultantes da monitorização e outros trabalhos de investigação envolvendo as lagoas açorianas relatam a presença de várias espécies de cianobactérias, frequentemente dominantes nestas águas. Só nas lagoas da ilha de São Miguel já foram identificadas mais de 40 espécies de cianobactérias (Gonçalves, 2008; Moreira *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Santos & Santana, 2003, 2009; Santos *et al.*, 2001, 2004, 2005, 2008). Algumas das espécies identificadas nestes trabalhos estão descritas na literatura científica como produtoras de toxinas, tais como *Anabaena scheremetievi* (Vasconcelos,

1993 - citado por Sarma, 2013), *Aphanizomenon flos-aquae* (Banker *et al.*, 1997) *Aphanizomenon gracile* (Costa *et al.*, 2006; Wiese *et al.*, 2010), *Aphanocapsa sp.* (Costa *et al.*, 2006), *Aphanothece sp.* (Baker & Humpage, 1994 - citado por Sarma, 2013), *Microcystis aeruginosa* (Harada *et al.*, 1993 - citado por Osswald *et al.*, 2007; Vasconcelos, 1993 - citado por Sarma, 2013), *Oscillatoria tenuis* (Brittain *et al.*, 2000), *Planktothrix agardhii* (Sivonen *et al.*, 1990) e *Woronichinia naegeliana* (Williame *et al.*, 2005). Estas espécies em geral são produtoras de cianotoxinas como microcistina, saxitoxina e anatoxina (Dauphard *et al.*, 2014; Sarma *et al.*, 2013).

Apesar da existência de espécies potencialmente produtoras de outras cianotoxinas, a monitorização em prática nos Açores foca-se apenas na deteção e quantificação de microcistinas, com recurso a métodos analíticos, como HPLC (Santos & Santana, 2003, 2009; Santos *et al.*, 2001, 2004; SRAM, 2011). A presença de outras toxinas como saxitoxinas e anatoxinas não está a ser monitorizada e dado o conhecimento da presença de espécies potencialmente produtoras destas toxinas em águas lagunares da região, deveria ser feita a monitorização e o controlo do potencial cianotóxico e da presença destas toxinas nestas águas.

A identificação e sequenciação do locus génico responsável pela biossíntese das microcistinas (Dittmann *et al.*, 1997; Nishizawa *et al.*, 1999; Tillett *et al.*, 2000) e posteriormente de outras cianotoxinas (e.g. Mihali *et al.*, 2008, 2009) permitiu o desenvolvimento de metodologias de análise molecular para a deteção e quantificação de cianotoxinas (e.g. Tillett *et al.*, 2001; Vaitomaa *et al.*, 2003; Rantala *et al.*, 2006). Os métodos moleculares podem servir como um *screening* inicial do potencial cianotóxico das massas de água, pois permitem a identificação de genes responsáveis pela produção destas toxinas, confirmando ou excluindo a necessidade da sua monitorização (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010).

Estes métodos moleculares, muito utilizados recentemente, têm um grande potencial na monitorização de massas de água (Cupples *et al.*, 2010), uma vez que permitem discriminar a presença de genótipos produtores anteriormente à produção da toxina, o que por sua vez traz uma vantagem enorme pois permite prever o risco cianotóxico de massas de águas, permitindo assim o alerta precoce (Pearson & Neilan, 2008). A determinação do potencial cianotóxico em águas e a prevenção são essenciais para evitar ameaças à saúde pública (Pearson & Neilan, 2008).

Os métodos moleculares permitem também distinguir espécies de cianobactérias produtoras das espécies não-produtoras. Ao contrário dos métodos químicos e biológicos,

os métodos moleculares são muito sensíveis e específicos (uso de *primers* específicos), são mais rápidos e económicos e permitem assim uma previsão mais rápida para o alerta do potencial e risco cianotóxico (Cupples *et al.*, 2010; Pearson & Neilan, 2008).

Tendo em consideração que são frequentes os *blooms* de cianobactérias nas águas superficiais dos Açores, que estudos anteriores demonstraram a existência de cianotoxinas em concentrações elevadas, que algumas águas são utilizadas para a produção de água para abastecimento e para fins recreativos e que as cianotoxinas colocam em risco a saúde humana, pretende-se com este trabalho:

- I. Detetar a presença em águas superficiais dos Açores de genes produtores de saxitoxina, anatoxina-a e microcistina, através de métodos moleculares;
- II. Testar e aperfeiçoar metodologias moleculares, baseadas em PCR e eletroforese de DNA na deteção de genes produtores de cianotoxinas;
- III. Isolar e cultivar as cianobactérias presentes em águas superficiais dos Açores de modo a avaliar a distribuição dos genes produtores de toxinas nas espécies existentes.

## 1.2. CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são um grupo filogenético de microrganismos unicelulares, procariotas, gram-negativos, de grande diversidade morfológica e grande importância ecológica (Garcia-Pichel, 2009; Oren, 2014; Whitton & Potts, 2012). Distinguem-se de outros procariotas por realizarem fotossíntese aeróbia, semelhante à das plantas superiores (têm fotossistema I e II) e, excetuando algumas espécies, são capazes de sintetizar clorofila *a* e ficobiliproteínas (Garcia-Pichel, 2009; Shevela *et al.*, 2013; Whitton & Potts, 2012). As ficobiliproteínas são proteínas que formam complexos capazes de absorver luz, designados de ficobilissomas, que atuam como acessórios fotossintéticos (Bermejo, 2014). Estas macromoléculas são uma família de proteínas pigmentares, hidrófilas, fluorescentes, coloridas e estáveis (Bermejo, 2014). As ficocianinas são ficobiliproteínas hidrófilas que podem ser divididas em três grupos de absorção: C-ficocianina ( $\lambda_{\max}$ ~610-620 nm), aloficocianina ( $\lambda_{\max}$ ~650-655 nm) e R-ficocianina ( $\lambda_{\max}$ ~550, 618 nm) (Bermejo, 2014). Algumas cianobactérias ainda têm outro tipo de ficocianinas, denominadas ficoeritrocianinas ( $\lambda_{\max}$ ~550 nm). Visualmente as ficocianinas podem variar entre o roxo (R-ficocianina e ficoeritrocianina), o azul escuro (C-ficocianina) e o azul ciano (aloficocianina) (Bermejo, 2014).

Tradicionalmente conhecidas como algas azuis (*blue-green* na língua inglesa) devido à sua pigmentação ciano (Chorus & Bartram, 1999; Vincent, 2009), ao tamanho dos indivíduos e à sua ecologia (Garcia-Pichel, 2009), são atualmente reconhecidas como procariotas fotossintéticos (Carmichael, 2008; Garcia-Pichel, 2009; Shevela *et al.*, 2013; Vincent, 2009).

São os organismos fotossintéticos mais antigos do planeta, existindo acerca de 3,5 mil milhões de anos (Paerl & Paul, 2012; Shevela *et al.*, 2013) e crê-se que são os organismos responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre (Garcia-Pichel, 2009; Oren, 2014; Shevela *et al.*, 2013).

### 1.2.1. METABOLISMO E ECOLOGIA

O metabolismo primário das cianobactérias consiste na oxidação de moléculas de água (H<sub>2</sub>O), que servem como dadoras de eletrões para a redução de dióxido de carbono em matéria orgânica e em moléculas de oxigénio (O<sub>2</sub>) - fotossíntese aeróbia (Garcia-Pichel, 2009; Shevela *et al.*, 2013). Para além da fotossíntese aeróbia, certas espécies têm

a capacidade de fazer fotossíntese anaeróbia (na ausência de luz e oxigênio) usando moléculas de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) como dadoras de elétrons (Cohen *et al.*, 1986; Garlick *et al.*, 1977; Padan, 1979; Shevela *et al.*, 2013). Algumas espécies fazem estes dois tipos de fotossíntese o que lhes conferem vantagem ecológica, outras recorrem a outra via de metabolismo na ausência de luz e dadores de elétrons, como a fermentação (Stal & Moezelaar, 1997).

As cianobactérias não produzem somente metabolitos primários, estas bactérias produzem uma grande variedade de metabolitos secundários, a maioria péptidos produzidos pela via das sintases não ribossomais (NRPS). Para a maioria destes compostos ainda não estão descritas as suas funções biológicas, no entanto sabe-se que estes compostos têm elevada importância farmacêutica e têm grande impacto na saúde pública (Garcia-Pichel, 2009).

Estas bactérias têm elevada dispersão ecológica (Shevela *et al.*, 2013) o que contribui para o seu sucesso competitivo, uma vez que para o seu ciclo de vida pode ser apenas necessário água (como dadora de elétrons), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), substâncias inorgânicas (e.g. azoto e fósforo) e luz (Chorus & Bartram, 1999).

Encontram-se distribuídas em vários ambientes aquáticos, como águas dulçaquícolas, e.g. lagos, lagoas, rios, albufeiras, canais de irrigação; águas salobras e águas marinhas, e.g. lagos de água salgada, estuários e oceanos (Garcia-Pichel, 2009; Whitton & Potts, 2012). Para além de ambientes aquáticos também são possíveis de encontrar em alguns solos e rochas (Percival *et al.*, 2004; Shevela *et al.*, 2013; Whitton & Potts, 2012), florestas, desertos, outros ambientes terrestres e ainda no ar (Cohen & Gurevitz, 2006; Garcia-Pichel, 2009; Shevela *et al.*, 2013). Embora dispersas por vários habitats, as cianobactérias são mais frequentes em meios aquáticos onde podem crescer em suspensão na água (formas planctónicas) ou associadas a substratos (formas bentónicas), principalmente agregadas a outras cianobactérias, a algas, ou a macrófitos (formas epífitas) (Quiblier *et al.*, 2013).

Em condições ótimas de crescimento, i.e., temperatura, luz, abundância de nutrientes (e.g. azoto, fósforo, ferro, molibdénio) entre outras características do próprio ecossistema aquático, as cianobactérias podem proliferar de forma exponencial, dando origem a *blooms*. Tais condições surgem maioritariamente em meses mais quentes, especialmente em águas de superfície e reservatórios (Merel, 2013; Paul, 2008). Nos últimos anos estes *blooms* têm ocorrido com maior frequência e cada vez mais se observam *blooms* tóxicos (Carmichael, 2008; O'Neil *et al.*, 2012).

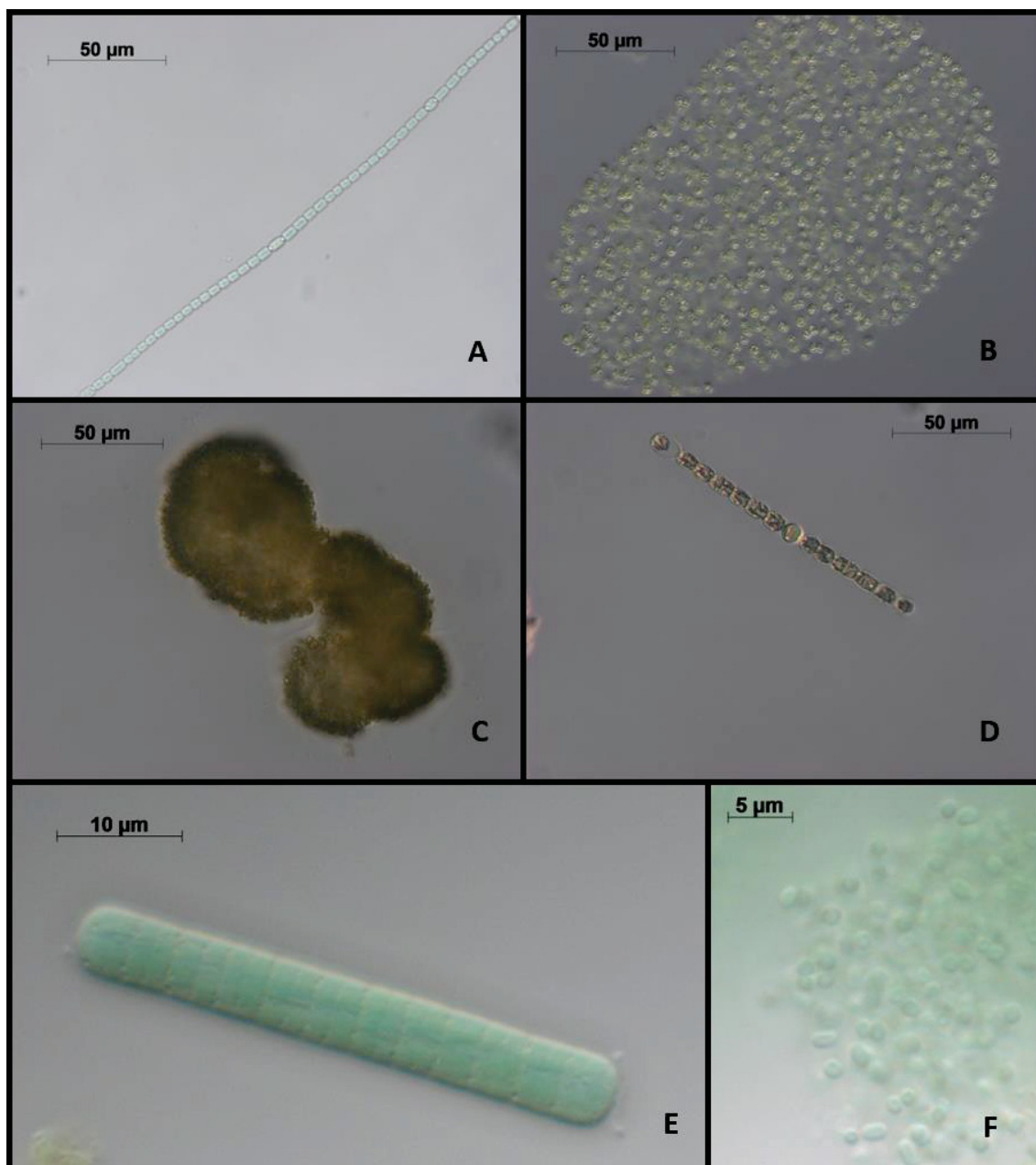
## 1.2.2. MORFOLOGIA E TAXONOMIA

As cianobactérias são procariotas, razão pelo qual não têm núcleo nem organelos membranares e possuem uma parede de peptidoglicano. No entanto, têm características incomuns a procariotas como a capacidade de fazer fotossíntese e produzir oxigênio (Vincent, 2009). Apesar da ausência de organelos, estas bactérias têm outras estruturas com funções específicas que garantem vantagens ecológicas às mesmas, tais como os tilacoides (membranas fotossintéticas, que contêm as ficobiliproteínas) e o nucleoplasma (contém todo o DNA circular) (Vincent, 2009).

São organismos com elevada variabilidade morfológica, mais diversos do que qualquer outro grupo de procariotas (Cohen & Gurevitz, 2006; Oren, 2014). Estas podem surgir em diversas formas (figura 1), nomeadamente cocoides, unicelulares ou coloniais (e.g. *Woronichinia naegeliana*, figura 1C), e filamentosas (e.g. *Anabaena sp.*, figura 1A) (Whitton & Potts, 2012). As formas unicelulares podem variar de tamanho desde 1  $\mu\text{m}$  até 30  $\mu\text{m}$ , sendo que a maioria tem à volta de 2  $\mu\text{m}$  (Percival *et al.*, 2004). As espécies filamentosas podem ter um diâmetro entre 0,4  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$ , mesmo na presença de um único tricoma estas conseguem ser mais extensas pela adição de células especializadas como os heterócitos e os acinetos (Whitton, 2008).

Os heterócitos são células maiores que as adjacentes, de parede dupla, incolores ou por vezes com tons amarelados, que podem ser cilíndricas ou retangulares (Sarma, 2013). Estas células são produzidas aquando da escassez de azoto, razão pela qual uma das suas funções é a fixação de azoto (Garcia-Pichel, 2009), funcionam como reservas para células adjacentes e surgem em alguns géneros filamentosos como *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema* e *Hapalosiphon* (Sarma, 2013). Estas características trazem vantagens competitivas para com outros organismos, ou mesmo em situações adversas (Whitton, 2008; Percival *et al.*, 2004). Os heterócitos são células muitas vezes cruciais para a classificação taxonómica de espécies de cianobactérias (Sarma, 2013).

Em espécies filamentosas também surgem outras estruturas, como os vacúolos gasosos que permitem às colónias se movimentarem em direção a zonas mais favoráveis na água, como por exemplo para locais com mais luz incidente, mais favoráveis para a fotossíntese (Vincent, 2009).



**Figura 1.** Fotografias de espécies de cianobactérias observadas. **A:** *Anabaena* sp.; **B:** *Microcystis flos-aquae*; **C:** *Woronichinia naegeliana*; **D:** *Aphanizomenon* sp.; **E:** *Oscillatoria tenuis*; **F:** *Aphanothece* sp.

Os acinetos são células especializadas e têm reservas de azoto na forma de grânulos de cianoficina, o que garante resistência quando em condições adversas (Garcia-Pichel, 2009; Vincent, 2009). As suas funções aparentam ser diferentes para os diferentes géneros de cianobactérias, mostrando ter atividade respiratória, capacidade de fixar azoto e sintetizar proteínas e lípidos (Sarma, 2013).

Tratando-se de organismos com elevada variabilidade morfológica e antiguidade, a sua classificação é complexa e difícil pelo que a reformulação da mesma é contínua (Komárek *et al.*, 2014). Uma das mais recentes revisões da classificação das cianobactérias foi proposta por Komárek *et al.* (2014), segundo a qual as cianobactérias



dividem-se em oito ordens, 46 famílias e mais de 70 géneros (tabela 1), com adaptação de alguns taxons antigos e a criação de novas ordens e famílias.

**Tabela 1.** Classificação taxonómica da classe *Cyanophyceae* (Komárek *et al.*, 2014).

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Géneros exemplificativos</b>
<b>I <i>Gloeobacterales</i></b>	<i>Gloeobacteraceae</i>	<i>Gloeobacter</i>
	<i>Synechococcaceae</i>	<i>Synechococcus</i>
	<i>Merismopediaceae</i>	<i>Aphanocapsa</i>
	<i>Prochloraceae</i>	<i>Prochlorococcus</i>
	<i>Coelosphaeriaceae</i>	<i>Woronichinia</i>
	<i>Acaryochloridaceae</i>	<i>Acaryochloris</i>
<b>II <i>Synechococcales</i></b>	<i>Chamaesiphonaceae</i>	<i>Chamaesiphon</i>
	<i>Romeriaceae</i>	<i>Cyanocatenula</i>
	<i>Pseudanabaenaceae</i>	<i>Pseudanabaena</i>
	<i>Leptolyngbyaceae</i>	<i>Leptolyngbya</i>
	<i>Heteroleibleiniaceae</i>	<i>Heteroleibleinia</i>
	<i>Schizotrichaceae</i>	<i>Schizothrix</i>
	<b>III <i>Spirulinales</i></b>	<i>Spirulinaceae</i>
<i>Microcystaceae</i>		<i>Microcystis</i>
<i>Aphanothecaceae</i>		<i>Aphanothece</i>
<i>Cyanobacteriaceae</i>		<i>Cyanobacterium</i>
<b>IV <i>Chroococcales</i></b>	<i>Cyanothrichaceae</i>	<i>Johannesbaptistia</i>
	<i>Stichosiphonaceae</i>	<i>Stichosiphon</i>
	<i>Chroococcaceae</i>	<i>Chroococcus</i>
	<i>Gomphosphaeriaceae</i>	<i>Gomphosphaeria</i>
	<i>Entophysalidaceae</i>	<i>Entophysalis</i>
	<i>Hydrococcaceae</i>	<i>Hydrococcus</i>
	<i>Dermocarpellaceae</i>	<i>Dermocarpella</i>
	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Xenococcus</i>
<b>V <i>Pleurocapsales</i></b>	<i>Pleurocapsaceae</i>	<i>Hyella</i>
	<i>Cyanothecaceae</i>	<i>Cyanothece</i>
	<i>Borziaceae</i>	<i>Borzia</i>
	<i>Coleofasciculaceae</i>	<i>Coleofasciculus</i>
	<i>Microcoleaceae</i>	<i>Arthrospira</i> <i>Planktothrix</i>
<b>VI <i>Oscillatoriales</i></b>	<i>Homoeotrichaceae</i>	<i>Homoeothrix</i> <i>Oscillatoria</i>
	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Phormidium</i> <i>Lyngbya</i>
	<i>Gomontiellaceae</i>	<i>Gomontiella</i>
	<b>VII <i>Chroococciopsidales</i></b>	<i>Chroococciopsidaceae</i>

Tabela 1. Cont.

Ordem	Família	Gêneros exemplificativos
VIII <i>Nostocales</i>	<i>Scytonemataceae</i>	<i>Scytonema</i>
	<i>Symphyonemataceae</i>	<i>Symphyonema</i>
	<i>Rivulariaceae</i>	<i>Rivularia</i>
	<i>Tolypothrichaceae</i>	<i>Tolypothrix</i>
	<i>Godleyaceae</i>	<i>Godleya</i>
	<i>Chlorogloeopsidaceae</i>	<i>Chlorogloeopsis</i>
	<i>Hapalosiphonaceae</i>	<i>Hapalosiphon</i>
	<i>Capsosiraceae</i>	<i>Capsosira</i>
	<i>Stigonemataceae</i>	<i>Stigonema</i>
	<i>Fortiaceae</i>	<i>Fortiea</i>
	<i>Gloeotrichiaceae</i>	<i>Gloeotrichia</i>
	<i>Aphanizomenonaceae</i>	<i>Anabaenopsis</i>
		<i>Aphanizomenon</i>
		<i>Cylindrospermopsis</i>
<i>Raphidiopsis</i>		
<i>Nostocaceae</i>	<i>Umezakia</i>	
	<i>Anabaena</i>	
	<i>Nostoc</i>	

### 1.3. CIANOTOXINAS

As florescências de algas prejudiciais, os designados *harmful algal blooms* (HABs), são uma preocupação pública a nível mundial, uma vez que muitas espécies de algas têm a capacidade de produzir toxinas (Dittmann *et al.*, 2013; O’Neil *et al.*, 2012). Em águas superficiais, a produção destas toxinas pode ser originária tanto de algas, como de dinoflagelados e até de bactérias como é o caso das cianobactérias (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Em geral, a toxicidade de microalgas é inferior dado que estas não proliferam tão intensamente, não havendo acumulação das suas toxinas, ao contrário do que acontece com as cianobactérias (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).

As toxinas produzidas por cianobactérias, conhecidas por cianotoxinas (Kurmayer & Christiansen, 2009; Sarma, 2013), têm uma ação prejudicial numa grande diversidade de organismos, incluindo humanos (Chorus *et al.*, 2000). A presença de cianotoxinas nas massas de água pode causar danos com a sua utilização, seja esta para a produção de água de abastecimento, para lazer ou outras (Paerl, 2008). O risco de danos associados à utilização de águas doces é maior, uma vez que as cianobactérias se adaptam melhor a este tipo de águas. No entanto, a sua presença em águas salgadas também pode acarretar

consequências como a intoxicação de mariscos e peixes que são usados para consumo humano (Chorus *et al.*, 2000). Em lagos, por exemplo, os *blooms* de cianobactérias podem aumentar o consumo de oxigênio, o que pode levar a hipoxia e anoxia provocando assim a morte de alguns peixes. Por outro lado, a presença destes *blooms* à superfície pode bloquear a penetração de raios solares nas águas alterando assim a dinâmica do lago (Paerl, 2008).

Os HBAs, e as cianotoxinas que destes advêm, afetam não só o dinamismo das massas de água, como a saúde de eucariotas e têm também um efeito nefasto em termos económicos e sociais, i.e., podem causar efeitos negativos em oportunidades de lazer, a redução de locais de pesca, a redução de fontes de abastecimento de água para consumo humano e para a agropecuária e podem levar a custos elevados para os tratamentos de remoção de cianobactérias e cianotoxinas (Hoagland *et al.*, 2002; Paerl, 2008).

Nem todas as cianobactérias são capazes de produzir toxinas e as espécies produtoras não são distintas morfológicamente das espécies não produtoras, pelo que os métodos taxonómicos de monitorização não garantem a segurança na utilização das massas de água, o que torna o risco iminente de intoxicação das águas um grave problema (Dittmann *et al.*, 1997; Rantala-Ylinen *et al.*, 2011). As cianotoxinas não são espécie-específicas, o que por sua vez também não facilita a previsão da potencialidade cianotóxica de determinadas águas, uma vez que podem coexistir diferentes espécies produtoras de uma mesma toxina em simultâneo (Davis *et al.*, 2009; Funari & Testai, 2008; Rantala *et al.*, 2006) e estas espécies produtoras podem produzir várias toxinas simultaneamente (Funari & Testai, 2008; Lee *et al.*, 2015).

As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura química (alcaloides, péptidos cíclicos ou lipopolissacarídeos) ou de acordo com os seus efeitos pós-intoxicação: Hepatotoxinas - microcistina (MC, MC-LR) e nodularina (NOD); Neurotoxinas – saxitoxina (STX) e anatoxina (ATX-a, ATX-a(s) e HMAN), Citotoxinas - cilindrospermopsina (CYN) e Dermatotoxinas - aplisiatoxina, debromoaplisiatoxina e lingbiatoxina (tabela 2) (Carmichael & Li 2006; Chorus *et al.*, 2000; Sarma, 2013).

A ocorrência, as propriedades químicas e os efeitos tóxicos de cianotoxinas têm sido estudados exhaustivamente, no entanto ainda se desconhece as suas funções, regulação e a razão da sua produção (Chorus *et al.*, 2000; Osswald *et al.*, 2007). Kaebnick & Neilan (2001), Wiegand & Pflugmacher (2005) e Holland & Kinnear (2013) são autores que propuseram algumas funções destas toxinas, tais como: alterar o

**Tabela 2.** Classificação de cianotoxinas, LD<sub>50</sub>, gêneros produtores e mecanismos de ação (Carmichael & Li 2006; Chorus *et al.*, 2000; Kaebernick & Neilan, 2001; Sarma, 2013; Wiegand & Pflugmacher, 2005).

Tipo de toxina	Cianotoxinas*	LD <sub>50</sub> (µg/kg)**	Gêneros produtores	Mecanismo de ação		
Hepatotoxinas	MC	45-1000	<i>Aphanizomenon</i> <i>Aphanocapsa</i> <i>Aphanothece</i> <i>Anabaena</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Hapalosiphon</i> <i>Microcystis</i> <i>Nostoc</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i> <i>Planktothrix</i> <i>Woronichinia</i>	Bloqueio de fosfatases proteicas em células hepáticas		
	MC-LR	60				
	NOD	30-50	<i>Nodularia</i>			
	STX	10-30	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i> <i>Raphidiopsis</i>		Bloqueio da despolarização pós-sináptica, pela ligação irreversível aos recetores da acetilcolina	
	ATX-a	250	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Arthrospira</i> <i>Microcystis</i> <i>Nostoc</i> <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> <i>Planktothrix</i> <i>Raphidiopsis</i>			
	HMAN	250	<i>Oscillatoria</i>		Homóloga da acetilcolinesterase, permite o potencial de ação contínuo	
	ATX-a(s)	40	<i>Anabaena</i>		Bloqueia a ação da acetilcolinesterase	
	Citotoxinas	CYN	200		<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Umezakia</i>	Bloqueia a síntese proteica

\* Ver códigos das cianotoxinas no texto

\*\*LD<sub>50</sub>, para ratos, de toxina pura

dinamismo populacional para vantagem ecológica, comunicação/sinalização celular por alelopatia (libertação de substâncias para alteração do crescimento de outro organismo vegetal) e quimiotaxia (libertação de substâncias para atração/repulsão de outros organismos), estabelecimento de relações com outras cianobactérias e/ou outros

organismos celulares, obtenção de nutrientes como o ferro, controlo de funções fisiológicas como o metabolismo interno e o aumento da resistência ao stress oxidativo. Holland & Kinnear (2013) ainda afirmam que as funções das cianotoxinas variam não só com o tipo de toxina como também com a espécie produtora e que a falta de informação na literatura científica, até ao momento, impede de se afirmar com certeza a(s) função/funções exata(s) de cada toxina.

### **1.3.1. HEPATOTOXINAS**

As hepatotoxinas são um grupo de péptidos cíclicos que afetam essencialmente os hepatócitos através da inibição de fosfatases proteicas (Honkanen *et al.*, 1990). Estas toxinas dividem-se em dois grupos as microcistinas (MCs) e as nodularinas (NODs) (Carmichael & Li 2006). Estruturalmente MCs e NODs são péptidos cíclicos e ambas têm um aminoácido hidrofóbico único - Adda, que é responsável pela sua toxicidade (Sarma, 2013). Qualquer alteração neste aminoácido provoca a redução da toxicidade destas toxinas (Sarma, 2013).

Estas toxinas atacam essencialmente o fígado, podendo levar a sintomas como fraqueza, perda de apetite, vômitos, diarreia e cancro (Sarma, 2013), podendo mesmo, em casos mais graves, provocar a morte. Vários relatos de eventos mortais em pássaros, animais selvagens, gado, peixes e humanos estão descritos na literatura (e.g. Jochimsen *et al.*, 1998; Kaebernick & Neilan, 2001).

#### **1.3.1.1. MICROCISTINAS**

As MCs são as cianotoxinas mais frequentes e mais estudadas e, pela mesma razão, são as mais relatadas na literatura científica (Nicholson & Burch, 2001; Merel *et al.*, 2013; Sarma, 2013). Ocorrências de MCs foram reportadas em grande parte do mundo, nomeadamente em vários países da Ásia, América do Norte, Leste da Europa e Norte de África (Fristachi & Sinclair, 2008)

Embora sejam mais comumente produzidas por *Microcystis aeruginosa*, de onde foram primeiramente isoladas (Botes *et al.*, 1984), muitas outras espécies são capazes de produzir MCs, designadamente várias espécies dos géneros *Microcystis*, *Planktothrix*,

*Anabaena*, *Anabaenopsis* e *Aphanizomenon* (tabela 3) (Humpage, 2008; Merel *et al.*, 2013; Sarma, 2013, Rastogi *et al.*, 2014a).

**Tabela 3.** Listagem de cianobactérias descritas, na literatura, como produtoras de cianotoxinas.

Gênero	Espécie	Toxina	Referência
<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena sp.</i>	ATX-a	Sivonen <i>et al.</i> , 1989*
		MC	James <i>et al.</i> , 1997
	<i>Anabaena bergii</i>	CYN	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	<i>Anabaena circinalis</i>	ATX-a	Sivonen <i>et al.</i> , 1989*
		MC	Schwimmer & Schwimmer, 1964***
		STX	Humpage <i>et al.</i> , 1994***
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	ATX-a	Gorham, 1964**
		ATX-a(s)	Mahmood & Carmichael, 1986a
		MC	Codd & Beattie, 1991****
		STX	Mahmood & Carmichael, 1986a
		MC	Sivonen <i>et al.</i> , 1990
	<i>Anabaena lammermannii</i> ,	ATX-a(s)	Onodera <i>et al.</i> , 1997
	<i>Anabaena lapponica</i>	CYN	Spoof <i>et al.</i> , 2006
	<i>Anabaena planktonica</i>	ATX-a	Bruno <i>et al.</i> , 1994***
<i>Anabaena mendotae</i>	ATX-a	Rapala <i>et al.</i> , 1993*	
<i>Anabaena scheremetievi</i>	MC	Vasconcelos, 1993***	
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Anabaenopsis sp.</i>	MC	Sivonen & Jones, 1999
	<i>Anabaenopsis millerii</i>	MC	Lanaras & Cook, 1994***
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Aphanizomenon sp.</i>	ATX-a	Sivonen <i>et al.</i> , 1989*
		STX	Mihali <i>et al.</i> , 2009
	<i>Aphanizomenon gracile</i>	MC	Costa <i>et al.</i> , 2006
		STX	Wiese <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	STX	Wiese <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	CYN	Humpage <i>et al.</i> , 1994***
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	MC	Moreno <i>et al.</i> , 2004
		CYN	Banker <i>et al.</i> , 1997
		STX	Sawyer <i>et al.</i> , 1968****
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanocapsa cumulus</i>	MC	Costa <i>et al.</i> , 2006
<i>Aphanothece</i>	<i>Aphanothece sp.</i>	MC	Baker & Humpage, 1994***
<i>Arthrospira</i>	<i>Arthrospira fusiformis</i>	ATX-a	Ballot <i>et al.</i> , 2004
<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Cylindrospermopsis sp.</i>	MC	Gkelis <i>et al.</i> , 2005
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	CYN	Hawkins <i>et al.</i> , 1985
		STX	Sawyer <i>et al.</i> , 1968***
<i>Hapalosiphon</i>	<i>Hapalosiphon hibernicus</i>	MC	Princep <i>et al.</i> , 1992***
<i>Lyngbya</i>	<i>Lyngbya wollei</i>	CYN	Seifert <i>et al.</i> , 2007
		STX	Carmichael <i>et al.</i> , 1997

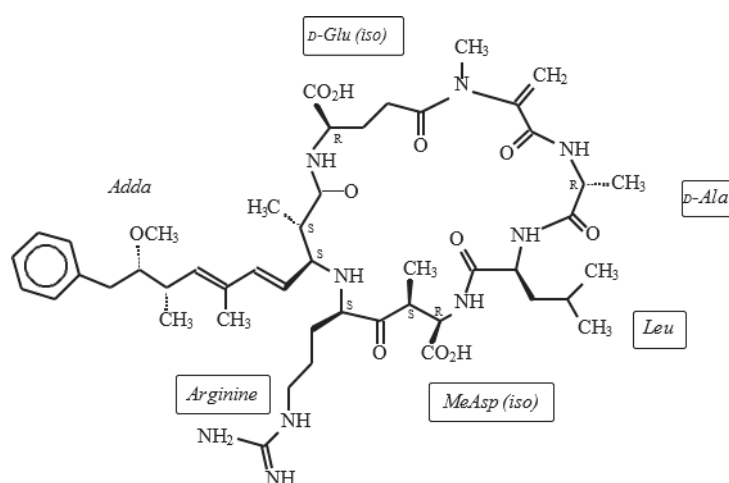
Tabela 3. Cont.

Género	Espécie	Toxina	Referência
<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis sp.</i>	MC	Hrudey <i>et al.</i> , 1994***
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	ATX-a	Harada <i>et al.</i> , 1993*
		MC	Vasconcelos, 1993***
	<i>Microcystis botrys</i>	MC	Onodera <i>et al.</i> , 1997
	<i>Microcystis novacekii</i>	MC	Costa <i>et al.</i> , 2006
	<i>Microcystis panniformis</i>	MC	Costa <i>et al.</i> , 2006
	<i>Microcystis protocystis</i>	MC	Costa <i>et al.</i> , 2006
	<i>Microcystis viridis</i>	MC	Kusumi <i>et al.</i> , 1987***
Watanabe <i>et al.</i> , 1986***			
<i>Microcystis wesenbergi</i>	MC	Vasconcelos, 1993***	
<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	MC	Beattie <i>et al.</i> , 1998***
	<i>Nostoc carneum</i>	ATX-a	Ghassempour <i>et al.</i> , 2005
<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria sp.</i>	ATX-a	Araóz <i>et al.</i> , 2005
		CYN	Mazmouz <i>et al.</i> , 2010
	<i>Oscillatoria agardhii</i>	MC	Hrudey <i>et al.</i> , 1994***
		ATX-a	Sivonen <i>et al.</i> , 1989*
	<i>Oscillatoria formosa</i>	HMAN	Skulberg <i>et al.</i> , 1992*
	<i>Oscillatoria limosa</i>	MC	Mez <i>et al.</i> , 1996***
<i>Oscillatoria tenuis</i>	MC	Brittain <i>et al.</i> , 2000	
<i>Phormidium</i>	<i>Phormidium sp.</i>	MC	Dittmann <i>et al.</i> , 2013
	<i>Phormidium favosum</i>	ATX-a	Gugger <i>et al.</i> , 2005
<i>Planktothrix</i>	<i>Planktothrix sp.</i>	MC	Hummert <i>et al.</i> , 2001
		STX	Pomati <i>et al.</i> , 2000
	<i>Planktothrix agardhii</i>	MC	Sivonen <i>et al.</i> , 1990
	<i>Planktothrix formosa</i>	HMAN	Skulberg <i>et al.</i> , 1992***
	<i>Planktothrix mougeotii</i> ,	MC	Henriksen <i>et al.</i> , 1996***
	<i>Planktothrix prolifica</i> ,	MC	WHO, 2003
<i>Planktothrix rubescens</i>	ATX-a	Viaggiu <i>et al.</i> , 2004	
<i>Raphidiopsis</i>	<i>Raphidiopsis brookii</i>	STX	Stucken <i>et al.</i> , 2010
	<i>Raphidiopsis curvata</i>	CYN	Li <i>et al.</i> , 2001
	<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	ATX-a	Namikoshi <i>et al.</i> , 2003
		CYN	McGregor <i>et al.</i> , 2011
<i>Umezakia</i>	<i>Umezakia natans</i>	CYN	Harada <i>et al.</i> , 1994
<i>Woronichinia</i>	<i>Woronichinia sp.</i>	MC	Williame <i>et al.</i> , 2005

\* Citado por Osswal *et al.*, 2007; \*\*Citado por Dauphard *et al.*, 2014; \*\*\*Citado por Sarma, 2013; \*\*\*\*Citado por Dow & Swoboda, 2002.

Estas toxinas são péptidos cíclicos com baixa massa molecular (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a) podendo variar desde os 800 aos 1100 Da, dependendo da composição dos aminoácidos nas posições de variabilidade e das modificações dos mesmos (figura 2) (Rastogi *et al.*, 2014a; Sivonen & Jones, 1999; Tillett *et al.*, 2000). Segundo Dittmann *et al.* (2013) existem mais de 80 variantes (isómeros químicos) desta toxina. A variedade de aminoácidos que constituem as MCs e a posição que estes assumem na sua estrutura,

nomeadamente nas posições 2 e 4 são a origem das vastas variantes desta toxina (Sarma, 2013). A MC-LR, a variante mais abundante e mais estudada das microcistinas, tem os aminoácidos L-leucina e L-arginina nas posições 2 e 4 respetivamente (figura 2) (Rastogi *et al.*, 2014a; Sarma, 2013). Existem outras variantes de MCs resultantes não só de alterações nas posições 2 e 4, bem como da demetilação em aminoácidos nas posições 3 e/ou 7, modificações do grupo Adda e alterações de aminoácidos nas posições 1, 6 e 7 (Rinehart *et al.*, 1994; Sivonen, 1996). Outra das particularidades destas toxinas é a presença de aminoácidos únicos, como Adda (*3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4-6-dienoic acid*) que é responsável pela toxicidade das MCs (Carmichael *et al.*, 1988; Sarma, 2013).



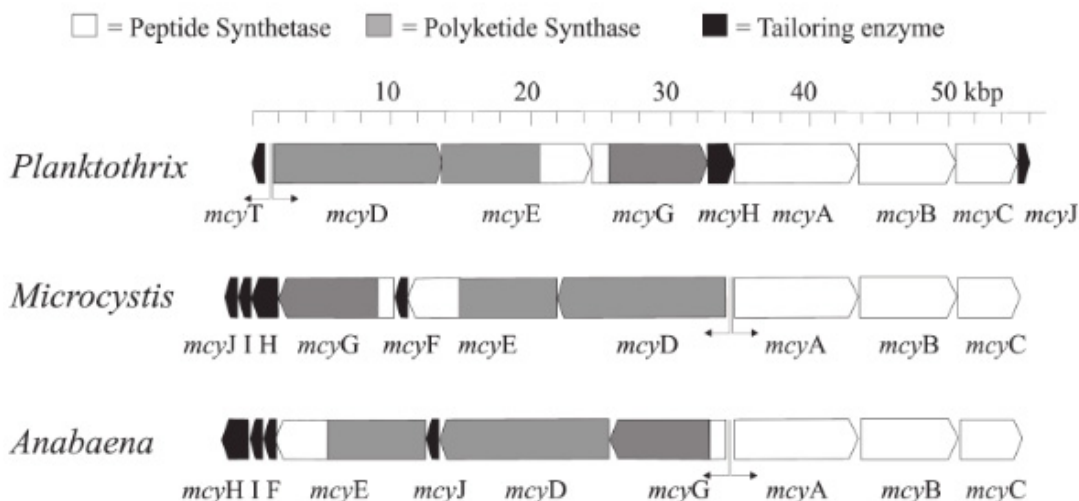
**Figura 2.** Estrutura química de microcistina (Fristachi & Sinclair, 2008).

As MCs são sintetizadas por mecanismos não ribossomais através de complexos multienzimáticos (Pearson & Neilan, 2008). Estes contêm módulos enzimáticos incluindo sintetases de péptidos não ribossomais –NRPS, e sintases de policetídeos –PKS (Rastogi *et al.*, 2014a).

O gene *cluster* responsável pela produção de microcistinas, *mcy*, contém 10 *Open Reading Frames* (ORFs) bidirecionais organizados em dois operões *mcyA-C* e *mcyD-J*, perfazendo um total de 55 kb (Neilan *et al.*, 2008; Tillett *et al.*, 2000). Estes codificam as enzimas responsáveis pelos mecanismos anteriormente mencionados (Kurmayer & Christiansen, 2009). A região promotora *mcyA-C* codifica três NRPS, já a região *mcyD-J* codifica uma PKS (*mcyD*), duas enzimas híbridas com módulos NRPS e PKS (*mcyE* e *mcyG*) (Tillett *et al.*, 2000), *tailoring enzymes* (*mcyF*), um aminoácido *racemase* - uma enzima responsável pela catalisação da reação L-aminoácido em D-aminoácido, (*mcyJ*) (Sielaff *et al.*, 2003), a enzima *D-2-hydroxy-acid dehydrogenase* (*mcyI*) (Pearson *et al.*,



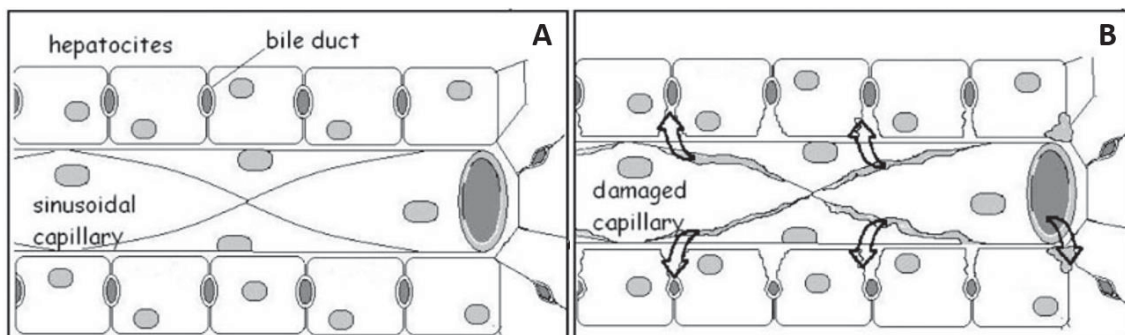
2006) e ainda componentes de um transportador ABC (*ATP-binding cassette transportes*) que são proteínas transmembranares responsáveis pelo transporte das MCs (*mcyH*) (Pearson *et al.*, 2004; Tillett *et al.*, 2000). A sequência dos ORFs e dos genes difere entre os géneros produtores das MCs (figura 3) e para alguns a sequência do gene *cluster* já foi determinada (Neilan *et al.*, 2008; Kurmayer & Christiansen, 2009).



**Figura 3.** Esquema estrutural da organização do gene *cluster* produtor de microcistinas em diferentes espécies produtoras (Kurmayer & Christiansen, 2009).

Após o contacto com um organismo, as MCs são absorvidas pelo sangue através da via de transporte do ácido biliar (Apeldoorn, 2007). Estas acabam por se acumular em órgãos como o fígado (Hitzfeld *et al.*, 2000), onde inibem fosfatases proteicas (PP1 e PP2A), causando a hiperfosforilação de componentes do citoesqueleto (Apeldoorn, 2007; Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). As fibras proteicas do citoesqueleto, constituídas por filamentos intermédios e microfilamentos, são as mais afetadas, uma vez que o equilíbrio destes é permitido devido à ação de fosfatases proteicas (remoção de grupos fosfato) e proteínase k (adição de grupos fosfato) (Carmichael, 1994, citado por Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). A inibição de fosfatases proteicas aumenta a fosforilação destes filamentos e provoca a dissociação dos mesmos, causando a desorganização do citoesqueleto e a perda de estrutura dos hepatócitos (Runnegar & Falconer, 1986, citado por Smith, 2014). A desorganização celular dos hepatócitos cria espaços entre os mesmos, havendo assim ausência de contacto entre estas células e os capilares sinusoidais (figura 4), o que por sua vez incita a acumulação de sangue no fígado (Carmichael, 1994, citado por Zaccaroni & Scaravelli, 2008a; Smith, 2014). A acumulação de sangue neste órgão

provoca danos teciduais, hemorragias, hipertrofia e em casos mais graves, se a concentração da toxina for elevada, a morte do indivíduo (Smith, 2014).

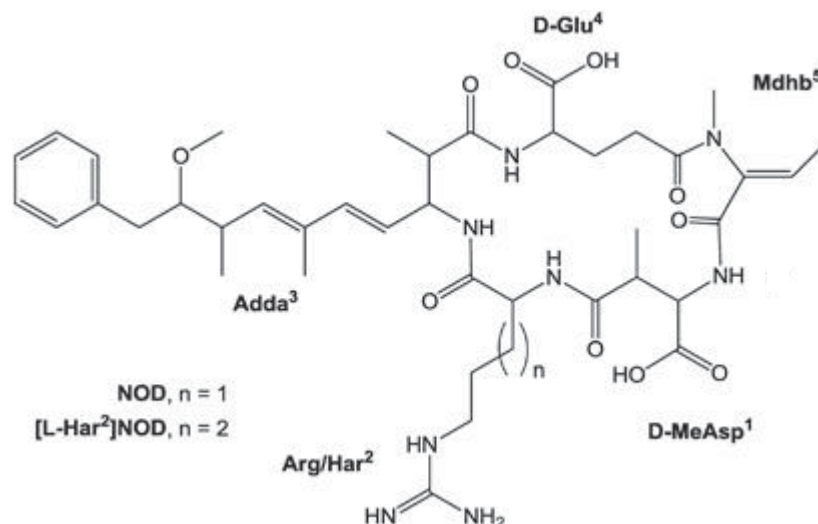


**Figura 4.** Esquema representativo da ação das microcistinas (adaptado de Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). **A:** situação normal; **B:** intoxicação.

Outro efeito nefasto à saúde provocado pelas MCs é o *stress* oxidativo devido à estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (Smith *et al.*, 2008; Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Este efeito diminui a capacidade antioxidante da célula e pode resultar em morte celular, o que a longo prazo incita a atividade tumoral (Smith *et al.*, 2008), uma vez que fosfatases e cinases não só influenciam a estrutura celular como regulam a proliferação celular (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Estas características fizeram com que as MCs fossem incluídas nas substâncias promotoras de tumores, pois ao interferirem com as fosfatases proteicas podem de facto impedir a paragem do ciclo celular em casos anómalos (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Muitos outros autores afirmam que apesar destas toxinas serem tumor-promotores, elas efetivamente não causam cancro, mas podem estimular o crescimento de células cancerígenas (Ito *et al.*, 1997; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Žegura *et al.*, 2008).

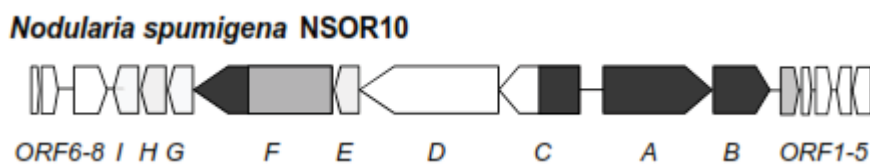
### 1.3.1.2 NODULARINAS

O péptido cíclico NOD tem uma estrutura muito semelhante às MCs, no entanto as NODs são compostas por 5 aminoácidos ao contrário das MCs que têm 7 aminoácidos (figura 5) (Rinehart *et al.*, 1994). Ambas possuem o grupo Adda, porém a *dehydroalanine* está substituída por *N-methyl-dehydrobutyrine* em NODs (Rinehart *et al.*, 1988). Para além da estrutura semelhante, ambas possuem toxicidades equivalentes (Rinehart *et al.*, 1988).



**Figura 5.** Estrutura química de nodularinas (Gehringer *et al.*, 2012).

A biossíntese de NODs, do mesmo modo que as MCs, é devida a um gene *cluster*, neste caso o *ndaS*, sendo que até ao momento está sequenciado e caracterizado para *Nodularia spumigena* NSOR10 (Moffitt & Neilan, 2004). Este gene *cluster* (figura 6) compreende 48 kb e nove ORFs (*ndaA-I*) (Neilan *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Esquema estrutural da organização do gene *cluster ndaS* (Neilan *et al.*, 2008).

Julga-se que o processo de biossíntese desta toxina seja semelhante ao da MC. Até ao momento sabe-se que os genes *ndaC*, *ndaD* e *ndaF* codificam subunidades malonyl-CoA (*ndaF* também codifica enzimas híbridas com módulos NRPS e PKS), *ndaA* e *ndaB* codificam enzimas NRPS, *ndaE* uma O-metiltransferase, *ndaG* enzimas *racemase* e *ndaI* componentes de um transportador ABC. Sabe-se ainda que *ndaH* tem 71% de homologia com *mcyI*, o que pode indicar que possivelmente codificam os mesmos produtos (Moffitt & Neilan 2004).

As NODs são apenas produzidas pelo género *Nodularia*, sendo produzidas principalmente pela espécie *Nodularia spumigena* (Humpage, 2008; Nicholson & Burch, 2001). Estas cianobactérias surgem essencialmente em águas salobras (Humpage, 2008).

As NODs são uma ameaça iminente à saúde humana pela contaminação de águas para consumo e pela acumulação em mariscos e peixes comestíveis (Humpage, 2008; Wiegand & Pflugmacher, 2005).

O seu modo de ação é muito semelhante às MCs, uma vez que ambas atacam os hepatócitos pela inibição de fosfatases proteicas (Campos & Vasconcelos, 2010), de onde resultam sintomas semelhantes (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). No entanto as NODs não se ligam covalentemente devido à alteração do grupo Adda (Martins & Vasconcelos, 2009).

### 1.3.2. NEUROTOXINAS

As neurotoxinas são os metabolitos secundários mais tóxicos produzidos por cianobactérias, pois interferem com o sistema neuromuscular (Sarma, 2013), paralisando os músculos respiratórios, esqueléticos e periféricos, através de diferentes mecanismos de ação (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).

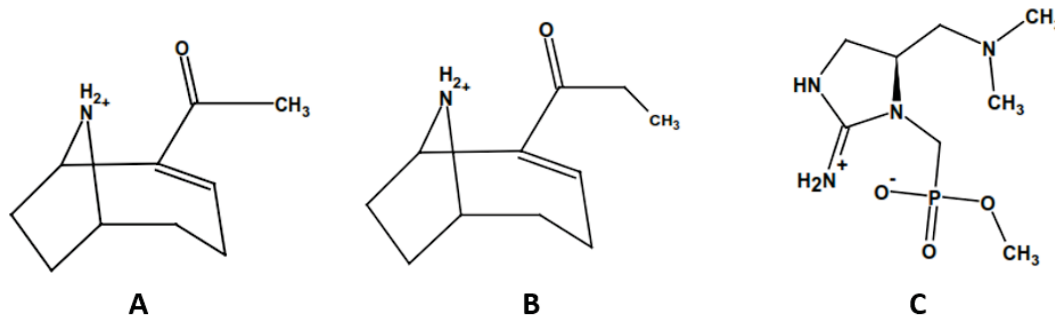
Estas toxinas dividem-se em anatoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s)), saxitoxinas e neosaxitoxinas (Dow & Swoboda, 2002).

#### 1.3.2.1. ANATOXINAS

As anatoxinas podem ser divididas em três neurotoxinas alcaloides: anatoxina-a (ATX-a); homoanatoxina-a (HMAN) e anatoxina-a(s) (ATX-a(s)) (Nicholson & Burch, 2001). Embora tenham nomes semelhantes, ATX-a e ATX-a(s) têm estruturas químicas distintas, já a HMAN é uma homóloga da ATX-a (figura 7) (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).

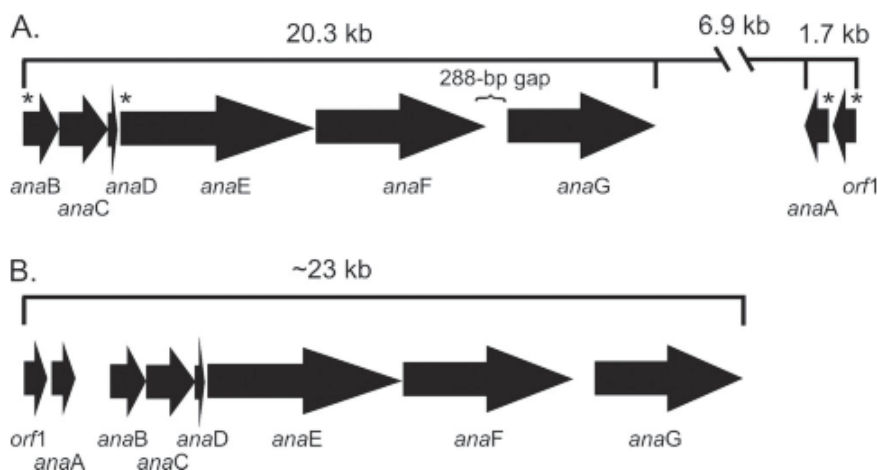
A ATX-a tem um peso molecular de 165 Da (Kaebernick & Neilan, 2001) e é estruturalmente análoga da cocaína e do neurotransmissor acetilcolina (Dow & Swoboda, 2002; Mazur-Marzec, 2006). Foi inicialmente isolada de *Anabaena flos-aquae* (Gorham, 1964 - citado por Dauphard *et al.*, 2014), no entanto muitas outras espécies estão descritas como produtoras desta toxina (tabela 3) (Sarma, 2013). A HMAN tem um peso molecular de 179 Da e difere estruturalmente da ATX-a por ter um grupo propanil em vez do grupo acetil em C-2 (figura 7) (Skulberg *et al.*, 1992). Esta toxina é produzida por estirpes de *Oscillatoria formosa* (tabela 3) (Méjean *et al.*, 2009). A ATX-a(s) é um éster único com um peso molecular de 252 Da (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Foi inicialmente isolada de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii* (Mahmood & Carmichael 1986b), no

entanto muitas outras espécies estão descritas como produtoras desta toxina (tabela 3) (Sarma, 2013).



**Figura 7.** Estrutura química de anatoxinas (adaptado de Sarma, 2013). A: anatoxina-a; B: homoanatoxina-a; C: anatoxina-a(s).

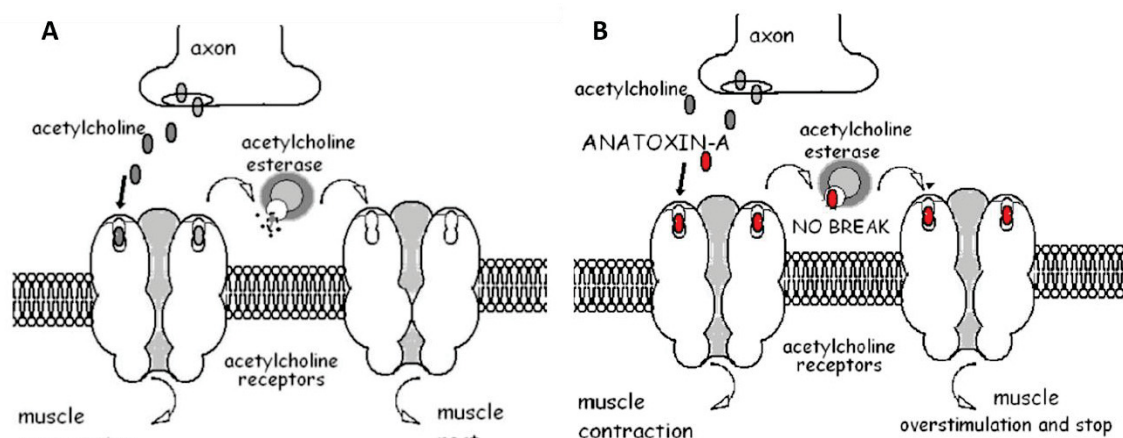
A biossíntese de ATX-a e HMAN deve-se ao gene *cluster ana* e, embora não se saiba muito sobre o mesmo, Méjean *et al.* (2009) e Rantala-Ylinen *et al.* (2011) descreveram o gene *cluster ana* em *Oscillatoria* PCC 6506 e *Anabaena sp.* estirpe 37, respetivamente (figura 8). Rantala-Ylinen *et al.* (2011) concluíram que os dois genes *clusters ana* são muito semelhantes, variando apenas na sequência dos genes (figura 8). O gene *cluster ana* compreende sete genes (*anaA-G*), perfazendo um total de ~29 kb em *Anabaena sp.* estirpe 37 e ~23 kb em *Oscillatoria* PCC 6506 (Rantala-Ylinen *et al.*, 2011).



**Figura 8.** Esquema do gene *cluster* responsável pela biossíntese de anatoxina-a e homoanatoxina-a (adaptado de Méjean *et al.*, 2009).

A ATX-a atua como homóloga da acetilcolina e como agonista dos recetores de acetilcolina em neurónios (Dow & Swoboda, 2002). Em situações normais a acetilcolina libertada pelos neurónios liga-se aos seus recetores e incita a abertura dos canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ). A entrada de sódio na célula despolariza a membrana o que leva à abertura de mais

canais  $\text{Na}^+$  e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (dependentes de voltagem), o que por sua vez provoca a criação de um potencial de ação e contração das células musculares, respetivamente (Soliakov *et al.*, 1995; Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). Posteriormente a degradação da acetilcolina pela acetilcolinesterase provoca o fecho dos canais de sódio, levando ao relaxamento muscular (figura 9) (Sarma, 2013; Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). A ATX-a ligasse de forma irreversível aos recetores de acetilcolina (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a) permitindo a passagem contínua de  $\text{Na}^+$  e, conseqüentemente, a superexcitação das células musculares (Sarma, 2013). Quando isto acontece em músculos respiratórios resulta na falta de  $\text{O}_2$  no cérebro e conseqüentemente em convulsões, sufocação e, em casos mais graves, morte (Dow & Swoboda, 2002; Mazur-Marzec, 2006).



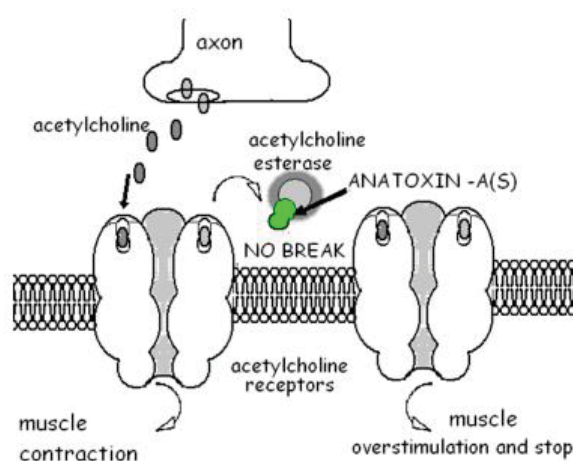
**Figura 9.** Modo de ação da anatoxina-a (adaptado de Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). **A:** situação normal; **B:** intoxicação.

A intoxicação por ATX-a pode ainda provocar fasciculação muscular, redução de movimentos, tremores, respiração ofegante, bruxismo (ranger dos dentes inconsciente), cianose (falta de oxigenação no sangue) e outros sintomas (Dauphard *et al.*, 2014; Zaccaroni & Scaravelli, 2008a). A intensidade da intoxicação e dos sintomas advindos dependem da quantidade de toxina ingerida e da massa corporal do organismo (Dow & Swoboda, 2002). Em ratos de laboratório a dose letal mediana ( $\text{LD}_{50}$ ) é de 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (tabela 2).

Um dos sintomas mais relevantes de ATX-a(s) é a salivação em vertebrados, razão pela qual a letra 's' está em sufixo no nome da toxina (Sarma, 2013). Estas ao contrário da ATX-a, bloqueiam a ação da acetilcolinesterase ligando-se à mesma e impedindo a degradação da acetilcolina (figura 10). O resultado final da presença de qualquer uma destas duas toxinas é semelhante, pois levam ambas à permanente abertura dos canais de

sódio, à corrente contínua de íons  $\text{Na}^+$  e à superexcitação muscular (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).

Do mesmo modo que ATX-a e HMAN, a intensidade da intoxicação e dos sintomas advindos, após contacto com anatoxina-a(s), depende da quantidade de toxina ingerida e da massa corporal do organismo (Dow & Swoboda, 2002). Para ratos, a  $\text{LD}_{50}$  de ATX-a(s), é muito inferior à da ATX-a (tabela 2), o que torna a ATX-a(s) muito mais tóxica que as restantes anatoxinas (Dow & Swoboda, 2002).



**Figura 10.** Modo de ação da anatoxina-a(s) (Zaccaroni & Scaravelli, 2008a).

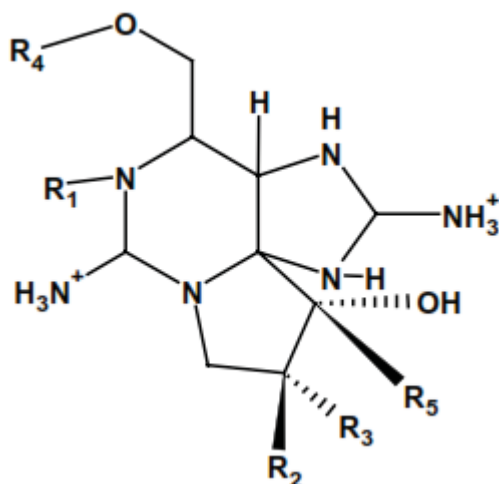
As anatoxinas já foram identificadas um pouco por todo o mundo: na Europa, Ásia, Sul de África, Austrália, América do Sul, Canadá e EUA (Dauphard *et al.*, 2014; Osswald *et al.*, 2007). Estas toxinas são uma ameaça para a saúde humana e animal, seja através da ingestão, inalação ou contacto e são ainda uma ameaça em suplementos alimentares, nomeadamente em suplementos provenientes de algas, que podem conter vestígios destas e outras cianotoxinas (Dauphard *et al.*, 2014).

### 1.3.2.2. SAXITOXINAS

As saxitoxinas (STXs) e os seus análogos estão incluídas nas *paralytic shellfish toxins* (PSTs) (Pearson *et al.*, 2010; Vale, 2014). Estas toxinas são alcaloides neurotóxicos, cuja estrutura química é definida como compostos tricíclicos não sulfatados (figura 11) (Dow & Swoboda, 2002; Kurmayer & Christiansen, 2009; Mihali *et al.*, 2009). O nome genérico saxitoxina foi proposto por Sivonen & Jones (1999) para as PSTs produzidas por cianobactérias de água doce.

Estruturalmente as STXs são divididas em saxitoxina e neosaxitoxina, que diferem apenas num grupo hidroxilo (Sarma, 2013). No entanto, existem cerca de 30 isoformas naturais destas toxinas (Mihali *et al.*, 2009; Sarma, 2013).

As STXs são compostos hidrossolúveis, termo estáveis, resistentes a ambientes ácidos e têm elevada toxicidade (Mihali *et al.*, 2009).



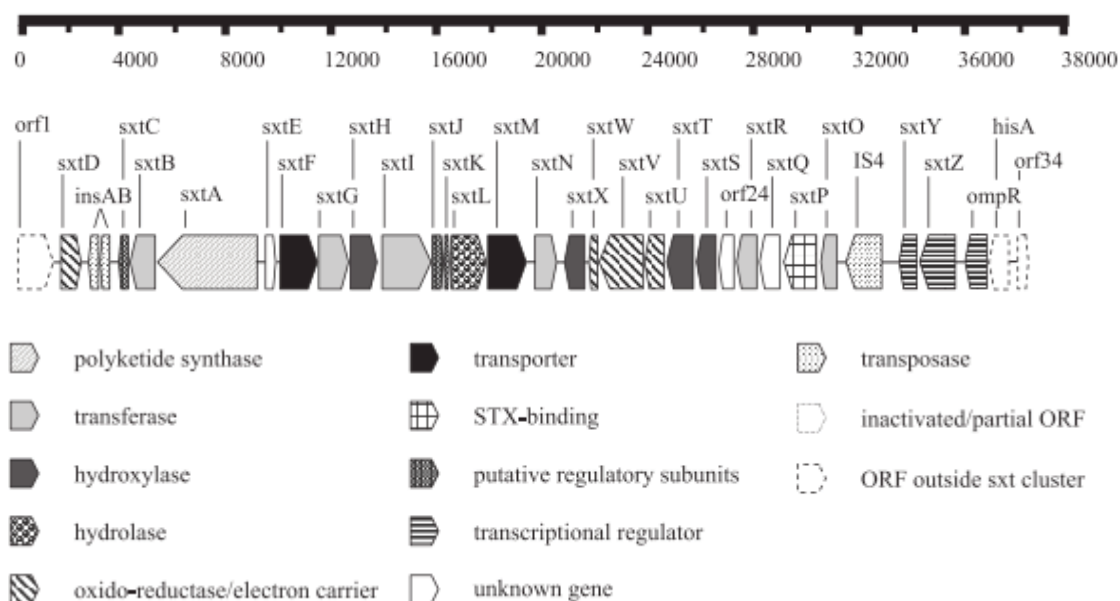
**Figura 11.** Estrutura química geral da saxitoxina, **R** representa as posições variáveis (Sarma, 2013).

Estas toxinas são encontradas maioritariamente em organismos marinhos, no entanto também surgem em meios dulçaquícolas (Mihali *et al.*, 2009). Inicialmente foram descobertas em dinoflagelados marinhos dos géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium* (Jančula *et al.*, 2014; Kurmayer & Christiansen, 2009; Wiese *et al.*, 2010). Em cianobactérias foram inicialmente identificadas em *Aphanizomenon flos-aquae* (Sawyer *et al.*, 1968, citado por Dow & Swoboda, 2002) mas, atualmente, sabe-se que são produzidas por uma grande variedade de cianobactérias (tabela 3) (Kurmayer & Christiansen, 2009).

Kellman *et al.* (2008) foram os primeiros a descrever o gene *cluster* produtor de STX, em *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, que é responsável pela biossíntese desta toxina em várias cianobactérias. O gene *cluster stx* é constituído por 26 genes (*stxA-Z*) perfazendo um total de 35 kb (figura 12). Mihali *et al.* (2009) também estudaram o gene *cluster stx*, mas em *Anabaena circinalis* AWQC131C e *Aphanizomenon sp.* NH-5 e chegaram à conclusão de que o gene *cluster* contém os mesmos genes em ambas as espécies, com a exceção dos genes *stxF*, *stxY*, *stxZ* e *ompR* que aparentam estar envolvidos na sinalização, regulação transcripcional e transporte da toxina em *C.*



*raciborskii* T3, pelo que podem ser regulados de modo diferente nas outras espécies ou podem ter sido transpostos para outro *locus* do genoma.

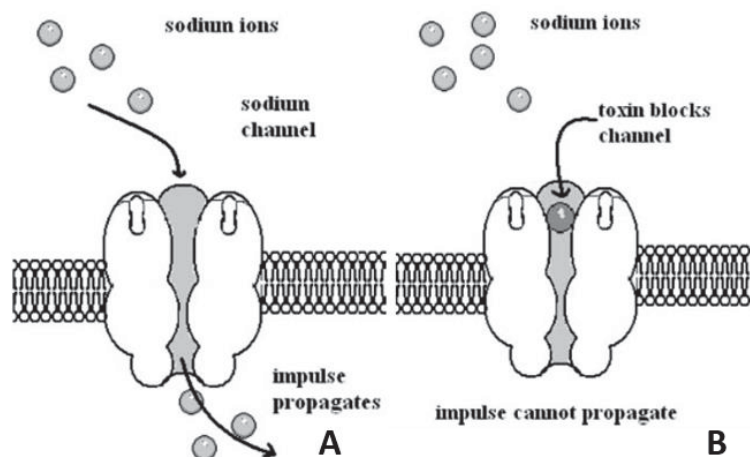


**Figura 12.** Estrutura do gene cluster *stx* em *C. raciborskii* T3 (Kellmann *et al.*, 2008).

Já o gene *stxPER* apenas aparece em *Anabaena circinalis* AWQC131C e *Aphanizomenon sp.* NH-5 e Mihali *et al.* (2009) julgam que este possa estar a substituir o gene *stxF* que é responsável pelo transporte da toxina. A função de alguns dos genes produtores da STX foi conjecturada (informaticamente) em ambos os trabalhos, no entanto a identificação de uma possível função não foi determinada para todos os genes. O estudo da biossíntese da STX é ainda muito recente e necessita maior investigação de modo a ser totalmente compreendida (Kellmann *et al.*, 2008; Mihali *et al.*, 2009).

As STXs são moléculas polares, razão pelo qual não passam a barreira sanguínea no cérebro e deste modo afetam apenas os nervos periféricos bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem, que regulam o potencial de ação ao longo dos neurónios (Zaccaroni & Scaravelli, 2008b). Estes canais de sódio são compostos por três subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2, sendo que  $\alpha$  tem a maioria das propriedades funcionais. Esta subunidade é por sua vez constituída por quatro domínios repetidos, I a IV, e cada um destes domínios tem 6 regiões (S1-S6) (Catterall, 2000; Goldin *et al.*, 2000). A STX ao ligar-se ao domínio I da subunidade  $\alpha$ , numa sequência de aminoácidos que liga S5 a S6, causa o bloqueio total do canal de sódio e impede a passagem de iões para o interior dos neurónios (figura 13). Este bloqueio do fluxo de iões impede a propagação do potencial

de ação e a liberação de neurotransmissores na placa sináptica, provocando a paralisia das células musculares (Zaccaroni & Scaravelli, 2008b).



**Figura 13.** Mecanismo de ação da saxitoxina nos canais de sódio (Zaccaroni & Scaravelli, 2008b). **A:** situação normal; **B:** intoxicação.

Os sintomas advindos da paralisia muscular causada por STX podem ter maior ou menor gravidade conforme a quantidade de toxina e o organismo afetado. Conforme a gravidade da intoxicação os seguintes sintomas podem surgir: dormência nos lábios, face e pescoço, sensação de picada nos dedos, dor de cabeça, tonturas, fraqueza e náuseas, fala incoerente, endurecimento e descoordenação dos membros, dificuldade respiratória, paralisia muscular, sensação de asfixia e em casos fatais, morte por paragem respiratória (FAO, 2004 - citado por Vale, 2014; Humpage, 2008). Em ratos a LD<sub>50</sub> da STX varia entre 10 e 30 µg/kg (tabela 2).

*Paralytic shellfish poisonings* (PSPs) é nome dado ao conjunto de sintomas que advêm do consumo de marisco infetado com PSTs. Esta é uma patologia que afeta os consumidores pela acumulação da toxina ao longo das cadeias tróficas (Kao, 1993 - citado por Humpage, 2008) e acabam por afetar gravemente a economia da pesca devido à contaminação de marisco (Kellmann *et al.*, 2008).

As PSTs são as toxinas mais potentes e são consideradas de elevado risco para a saúde pública e ambiental, pois podem afetar humanos e até ecossistemas inteiros (Kaas *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Zaccaroni & Scaravelli, 2008b). É estimado que anualmente cerca de 2000 casos de intoxicação por STX em humanos ocorra a nível mundial e cerca de 15-50% destes casos resultam em fatalidades (Van Dolah, 2000). Existem relatos de que STXs já foram encontradas a nível mundial, mais propriamente na Austrália, América do Sul (Brasil, México), América do Norte (EUA), Europa

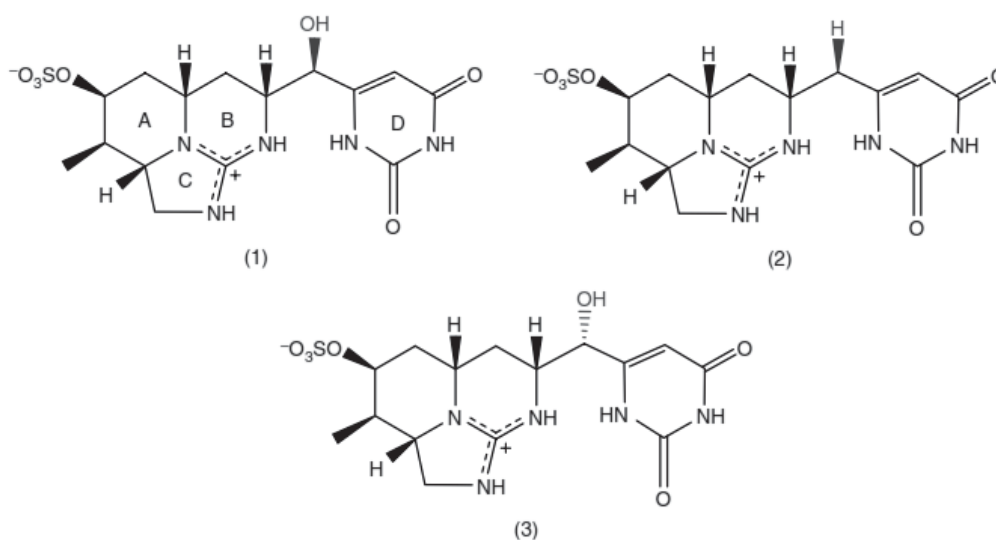
(Portugal, Espanha, França, Itália, Dinamarca, Finlândia, Bulgária, Alemanha e República Checa) e Ásia (China) (Jančula *et al.*, 2014).

### 1.3.3. CITOTOXINAS

#### 1.3.3.1. CILINDROSPERMOPSINAS

As cilindrospermopsinas (CYN) são alcaloides com um grupo uracilo distinto. Este grupo uracilo ligado a uma guanidina tricíclica é a base da toxicidade desta toxina e a perda do mesmo provoca a perda da toxicidade (Furey *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2012). A CYN foi descoberta inicialmente em *Cylindropermopsis raciborskii*, no entanto é produzida por muitas outras espécies de cianobactérias (tabela 3) (Moreira *et al.*, 2012).

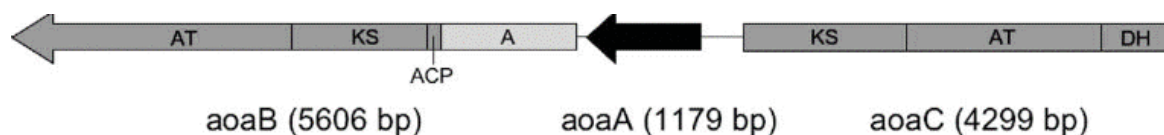
São conhecidos até ao momento três isómeros químicos (figura 14) de CYN, todos eles com elevada estabilidade e resistência a diversas fontes de luz, temperatura e pH, podendo por vezes mostrar resistência a tratamentos que são aplicados nas massas de água (de la Cruz *et al.*, 2013). A sua estrutura molecular sugere que a sua síntese é feita através do mecanismo não ribossomal, através de complexos multienzimáticos NRPS e PKS (Neilan *et al.*, 2008), tal como acontece com as MCs (Rastogi *et al.*, 2014a).



**Figura 14.** Estrutura química da cilindrospermopsina (1) e das suas variantes 7-deoxi-cilindrospermopsina (2) e 7-epicylindrospermopsina (3) (Moreira *et al.*, 2012).

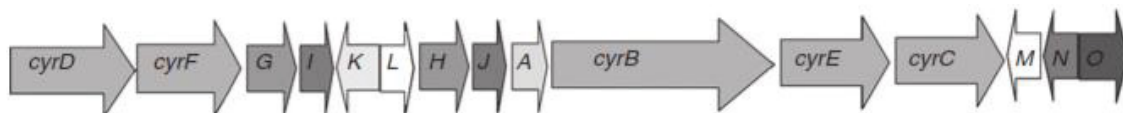
A produção destas toxinas a nível genético é determinada pela ação de vários genes (Neilan *et al.*, 2008). Os genes *aoaA*, *aoaB* e *aoaC* foram parcialmente sequenciados e identificados como responsáveis pela produção de CYN em

*Aphanizomenon ovalisporum* (figura 15) (Neilan *et al.*, 2008). Em *Cylindrospermopsis raciborskii* foi identificado o gene *cluster cyr* que contém genes ortólogos aos genes *aoa* (Barón-Sola *et al.*, 2011). Este gene *cluster* compreende 43 kb onde estão inseridas 15 ORF's. Na figura 16 pode ver-se a organização esquemática do gene *cluster cyr*, que permite a síntese, regulação e exportação da toxina em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Moreira *et al.*, 2012).



**Figura 15.** Organização de *aoaA*, *aoaB*, *aoaC* em *Aphanizomenon ovalisporum* (Neilan *et al.*, 2008).

O modo de ação desta toxina está ainda pouco estudado, no entanto sabe-se que inibe irreversivelmente a síntese de proteínas e/ou enzimas (Furey *et al.*, 2014), provoca a necrose celular, fragmentação de DNA e mutagênese (Smith *et al.*, 2008). Sintomas como hepatite, lesões renais e intestinais, vômitos, cefaleia, dores abdominais, anorexia, prisão de ventre e melena ou hematoquesia, hematúria, glicosúria e proteinúria surgem após intoxicação com CYN (de la Cruz *et al.*, 2013; Duy *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2012).



**Figura 16.** Organização do gene *cluster cyr* em *C. raciborskii* (Moreira *et al.*, 2012). *cyrA*: amidinotransferase; *cyrD*, *cyrF*, *cyrB*, *cyrE*, *cyrC*: PKS/NRPS; *cyrG*, *cyrH*: anel de uracilos; *cyrI*, *cyrJ*, *cyrN*: tailoring enzymes; *cyrK*: transporte; *cyrO*: regulação; *cyrL*, *cyrM*: transposases.

Devido ao pouco que se sabe sobre o modo de ação desta toxina e devido aos sintomas que surgem após intoxicação, alguns autores como Fristachi & Sinclair (2008), Rai *et al.* (2013) e Sarma (2013) classificam as CYN como hepatotoxinas. Pelo contrário, outros como Bormans *et al.* (2014), Moreira *et al.* (2012), Sivonen & Jones (1999) e Zaccaroni & Scaravelli (2008a) classificam-na como uma citotoxina, tal como é apresentada neste trabalho. Segundo Bain *et al.* (2008) esta toxina é hepatotóxica, citotóxica e genotóxica.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. PLANIFICAÇÃO GERAL**

O presente trabalho incidiu no estudo da potencialidade cianotóxica em catorze lagoas da ilha de São Miguel, Açores.

Inicialmente o trabalho recaiu sobre a otimização de protocolos para a análise molecular, principalmente o protocolo para a extração de DNA direta a partir de amostras de água.

Em seguida procedeu-se a colheitas mensais (março a julho de 2015), sendo que em cada amostragem foram feitas colheitas de amostras de água, foram medidos parâmetros físico-químicos da água *in situ* e registadas as condições climatéricas no momento da amostragem. A partir das amostras de água foi determinada a concentração de clorofila *a*, foi efetuado o isolamento de exemplares de cianobactérias para a obtenção de culturas de cianobactérias presentes em águas superficiais dos Açores e procedeu-se à análise molecular após extração de DNA diretamente de amostras ambientais e de isolados.

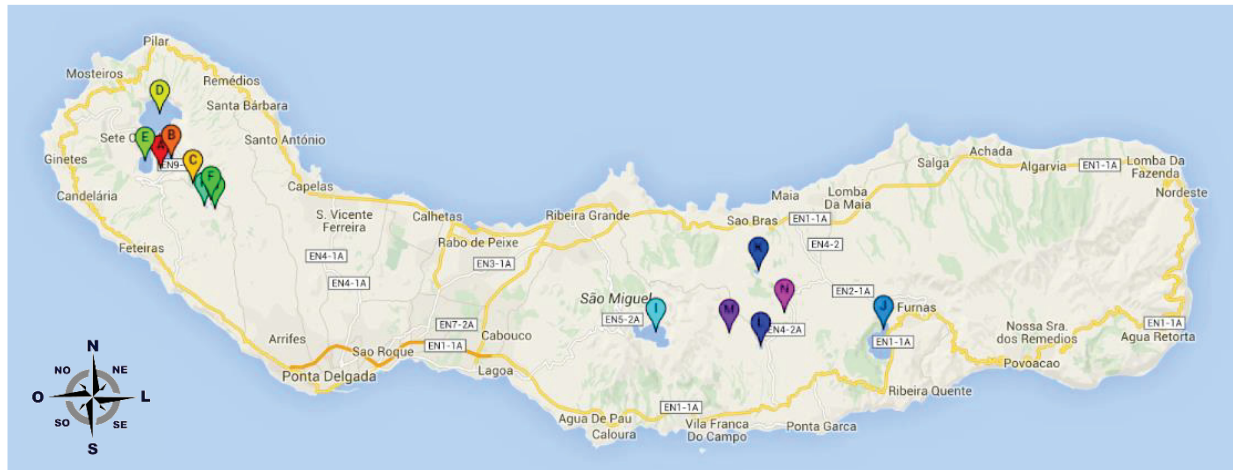
Na análise molecular fez-se primeiramente uma reação em cadeia da polimerase (PCR) de modo a detetar a presença de DNA de cianobactérias usando um par de *primer* específico para um fragmento do gene produtor da ficocianina. As amostras com amplificação para o gene produtor deste pigmento foram, posteriormente, testadas para a presença de genes produtores de toxinas usando pares de *primers* específicos para as mesmas, através de PCR.

Finalmente, com os resultados obtidos pretendeu-se prever a presença ou ausência da potencialidade cianotóxica para cada lagoa estudada, bem como a relação desta potencialidade com os parâmetros físico-químicos e biológicos destas águas.

### **2.2. ÁREA DE ESTUDO**

As lagoas amostradas localizam-se na ilha de São Miguel (figura 17) e foram selecionadas com base na sua importância em atividades turísticas, recreativas e de lazer, bem como atividades agropecuárias (Gonçalves, 2008; SRAM, 2011, 2013). Como se pode observar na figura 17, foram selecionadas 14 lagoas na ilha de São Miguel: lagoa Azul (A(Mi)), lagoa Verde (V(Mi)), lagoa de Santiago (ST(Mi)), lagoa Rasa das Sete Cidades (RS(Mi)), lagoa do Canário (CN(Mi)), lagoa das Empadadas Sul (ES(Mi)), lagoa

das Empadadas Norte (EN(Mi)), lagoa Rasa da Serra Devassa (R(Mi)), lagoa do Fogo (FG(Mi)), lagoa do Areeiro (AR(Mi)), lagoa do Congro (CG(Mi)), lagoa do Pico D’el Rei (PDR(Mi)), lagoa de São Brás (SB(Mi)) e lagoa das Furnas (FN(Mi)). Estas lagoas integram a rede de monitorização das massas de água interiores da região hidrográfica dos Açores, excetuando as lagoas do Areeiro e Pico D’el Rei por não serem massas de água designadas ao abrigo da Diretiva Quadro da Água (DQA) segundo os critérios da Região Autónoma dos Açores (SRAM, 2011).



**Figura 17.** Mapa da ilha de São Miguel indicando a localização das lagoas estudadas. (A) RS(Mi); (B) ST(Mi); (C) CN(Mi); (D) A(Mi); (E) V(Mi); (F) EN(Mi); (G) ES(Mi); (H) R(Mi); (I) FG(Mi); (J) FN(Mi); (K) SB(Mi); (L) CG(Mi); (M) AR(Mi); (N) PDR(Mi).

Segundo Gonçalves (2008) estão definidos dois tipos de lagoas nos Açores: lagoas profundas (de pequena a grande dimensão, situadas a média altitude, com predomínio das comunidades planctónicas relativamente às bentónicas) e lagoas pouco profundas (de baixa profundidade, sem estratificação, de muito pequena dimensão, localizadas a média a elevada altitude, com predominância das comunidades bentónicas litorais). A tabela 4 resume algumas das principais características das 14 lagoas estudadas neste trabalho.

### 2.3. AMOSTRAGENS

Foram colhidas amostras de água entre setembro de 2014 e julho de 2015, sendo que de setembro a fevereiro as amostragens foram feitas para a experimentação e otimização das técnicas, como a extração de DNA e o isolamento de cianobactérias. De março a julho as amostragens foram periódicas (mensais).

Todas as amostragens foram feitas nas margens das lagoas com recurso a uma rede de fitoplâncton com porosidade de 10 µm, de modo à amostra colhida ter maior

concentração dos organismos presentes nas águas. Cada amostra foi guardada em frascos esterilizados de 50 ml e analisada (extração de DNA e isolamento) até um máximo de 24 horas após colheita.

Os parâmetros analisados nestas amostragens mensais estão descritos posteriormente.

**Tabela 4.** Resumo das características das lagoas estudadas (Gonçalves, 2008; Pereira *et al.*, 2014; SRAM, 2013). **PDL:** Ponta Delgada; **PV:** Povoação; **RG:** Ribeira Grande; **VFC:** Vila Franca do Campo.

Lagoa	Concelho	Tipologia	Altitude (m)	LA (km <sup>2</sup> )	Temp (°C)	pH	Cond (µS/cm)	Chl- <i>a</i> (µg/L)
<b>A(Mi)</b>	PDL	Profunda	260	3,5868	16,48	7,83	94,55	5,35
<b>AR(Mi)</b>	VFC	Pouco Profunda	630	0,0045	11,10	5,60	39,80	1,65
<b>CG(Mi)</b>	VFC	Profunda	420	0,0370	16,30	8,47	91,70	30,12
<b>CN(Mi)</b>	PDL	Pouco Profunda	750	0,0178	14,50	6,46	37,83	11,40
<b>EN(Mi)</b>	PDL	Pouco Profunda	740	0,0175	14,10	6,62	33,80	11,17
<b>ES(Mi)</b>	PDL	Pouco Profunda	750	0,0048	13,70	6,95	49,40	4,89
<b>FG(Mi)</b>	VFC/RG	Profunda	574	1,4366	12,63	7,59	49,35	4,08
<b>FN(Mi)</b>	PV	Profunda	280	1,9257	17,13	8,22	128,75	38,54
<b>PDR(Mi)</b>	PV	Pouco Profunda	627	0,0010	10,90	8,85	68,30	205,94
<b>R(Mi)</b>	PDL	Pouco Profunda	765	0,0331	10,83	6,65	46,73	2,89
<b>RS(Mi)</b>	PDL	Pouco Profunda	545	0,0393	14,73	6,07	34,15	2,15
<b>SB(Mi)</b>	RG	Pouco Profunda	610	0,0582	15,33	6,91	35,85	33,35
<b>ST(Mi)</b>	PDL	Profunda	360	0,2535	15,60	8,50	118,75	7,70
<b>V(Mi)</b>	PDL	Profunda	260	0,8563	15,78	8,61	118,51	26,19

## 2.4. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

### 2.4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS LAGOAS

Nas amostragens mensais foram registados *in situ*, no momento da colheita, os seguintes parâmetros: condutividade (µS/cm), temperatura (°C) e pH da água com recurso a uma sonda multiparâmetros Horiba U-50. As condições ambientais foram também anotadas no momento da colheita.

## **2.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA *a***

A análise de clorofila *a* presente nas lagoas fez-se por espectrofotometria, de acordo com a norma portuguesa N°4327 (IPQ, 1997). Foi colhido 1l de água de cada lagoa, que posteriormente (2-4 horas após a sua colheita) foi filtrada (volume= 0,1-1l) com recurso a uma rampa de filtração usando filtros de fibra de vidro Whatman GF/C, com 47 mm de diâmetro, a pressão inferior a 0,75 atm, de modo evitar perdas de clorofila por fragmentação das células (Tailling, 1974).

Para a extração dos pigmentos utilizou-se como solvente a acetona a 90% (v/v), cerca de 18-24 horas, a 4°C. Posteriormente foi feita a centrifugação das amostras durante 10 minutos a 3000 g, de modo a clarificar a amostra e usar o sobrenadante para leitura no espectrofotómetro JENWAY 6505, com células espectrofotométricas de vidro, com um percurso ótico de 1 cm. A absorvência dos extratos foi lida a 430 nm, 665 nm e 750 nm, antes e 3 minutos após acidificação com 0,1 ml de HCl (0,1 M). A determinação da concentração de clorofila *a* em cada amostra foi obtida através do método de Lorenzen (1967).

## **2.5. ISOLAMENTO, CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS**

### **2.5.1. ISOLAMENTO EM AGAR**

Das amostras obtidas foi feito o isolamento de diversas espécies de cianobactérias, de modo a se obter os primeiros isolados destes organismos nos Açores.

O isolamento em agar (outubro/2014 - fevereiro/2015) foi feito inicialmente pelo espalhamento de três a quatro gotas de amostra ambiental em placas com meio comercial TFI+M (anexo I), a uma concentração de agar a 2%. Após evidencia de crescimento, por observação, foi feito o isolamento das colónias de interesse com recurso a uma lupa e a uma pipeta de Pasteur modificada, para tubos de ensaio com 2 ml de TFI+M. Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, com intensidade luminosa de 3000-3500 LUX e fotoperíodo de 14 horas.

A identificação das espécies presentes nos isolados foi efetuada em microscopia ótica, com recurso ao microscópio ZEISS AXIOIMAGE A1, seguindo floras específicas (e.g. Komárek & Anagnostidis 2001).



## 2.5.2. ISOLAMENTO EM MICROSCOPIA INVERTIDA

O isolamento por microscopia invertida (março/2015 – junho/2015), com recurso ao microscópio invertido Euromex Holland, série VT, foi feito até um máximo de 24 horas após a colheita das amostras. Os isolados obtidos por este método foram mantidos numa câmara climatizada em meio TFI+M (anexo I), a uma temperatura média de 25°C, intensidade de luz entre 500-1500 LUX e fotoperíodo de 14 horas.

A identificação das espécies presentes nos isolados foi efetuada em microscopia ótica, com recurso ao microscópio ZEISS AXIOIMAGE A1, seguindo floras específicas (e.g. Komárek & Anagnostidis 2001).

## 2.6. ANÁLISE MOLECULAR

### 2.6.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A parte inicial do trabalho focou-se na realização de ensaios-teste para determinar um protocolo eficiente para a extração de DNA de cianobactérias diretamente de amostras de água. Numa primeira abordagem utilizou-se um protocolo com base no detergente CTAB (adaptado de Doyle & Doyle, 1987), próprio para a extração de DNA de plantas (anexo II). Nesta fase testou-se o modo de obtenção do *pellet* ambiental para a extração por centrifugação e por filtração. A centrifugação das amostras fez-se com recurso à mini centrífuga *miniSpin® plus – eppendorf* e após centrifugação de 2 ml de amostra descartou-se o sobrenadante. Numa segunda abordagem testou-se a filtração de água das lagoas com recurso à técnica de filtração por vácuo usando filtros de acetato de celulose, com 45 mm de diâmetro, tendo-se filtrado um volume variável, dependendo da concentração de partículas em suspensão na amostra. Após a filtração aproveitou-se o conteúdo dos filtros que foi removido com auxílio de um bisturi e colocado num *eppendorf* esterilizado. Posteriormente testou-se o protocolo *PureLink™ Plant, Total DNA Purification Kit - Invitrogen* (anexo III). Com este protocolo também se testou o volume de água necessário para a centrifugação e obtenção do *pellet* ambiental (30 ml, 5,5 ml e 2 ml de amostra de água). O protocolo *DNeasy® Plant mini kit – Qiagen* (anexo IV) foi também testado. O último protocolo utilizado foi adaptado de Singh *et al.* (2011), um protocolo com base no detergente CTAB próprio para a extração de DNA de cianobactérias, usado diretamente em amostras de água e em isolados de cianobactérias (anexo V).

Para as amostragens mensais, a extração de DNA foi realizada usando o protocolo adaptado de Singh *et al.* (2011), sendo que o mesmo foi sendo otimizado ao longo de todo o trabalho. Este protocolo foi aplicado nas amostras ambientais (água das lagoas, cerca de 24 horas após a sua colheita) e nos isolados obtidos ao longo do trabalho.

Após cada extração as amostras de DNA foram analisadas por espectrofotometria para quantificar e avaliar a qualidade do DNA extraído, usando o Nanodrop 2000 (*ThermoScientific*).

## 2.6.2. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE PRODUTOR DE FICOCIANINA

Em todas as amostras de DNA, após quantificação, foi feito o *screening* para a presença de DNA pertencente a cianobactérias usando o par de *primer cpcB-A* (PC $\beta$ -F: 5'-GGCTGCTTGTTCACGCGACA-3' e PC $\alpha$ -R: 5'-CCAGTACCAGCAACTAA-3'; 685 bp - Neilan *et al.*, 1995) para a amplificação do fragmento do gene produtor da ficocianina (PC-IGS). As amplificações por PCR convencional foram realizadas num termociclador *Biometra*. Para a amplificação deste gene as condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 47°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), finalmente seguiu-se a extensão final de 7 minutos a 72°C, ficando depois em pausa indefinida a 10°C. A composição do *mix* de reação encontra-se descrita na tabela 5.

**Tabela 5.** Composição do *mix* de reação para o par de *primer cpcB-A* (Neilan *et al.*, 1995)

Componentes	Quantidades-base ( $\mu$ l)
Tampão 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75
dNTPs 10mM	0,5
Taq Polimerase	0,2
<i>Primer</i> 3pmol	0,5 (x2)
Amostra	4
H <sub>2</sub> O	16,05
Total	<b>25</b>

Para a análise dos produtos amplificados recorreu-se a eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem constante de 100 V. Os géis foram revelados com SYBR<sup>®</sup> Safe (*Invitrogen*) através de um transiluminador *Molecular Imager<sup>®</sup> - Gel Doc<sup>TM</sup> XR<sup>+</sup>* (*BioRad*).

### 2.6.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS GENES PRODUTORES DE CIANOTOXINAS

A detecção dos genes produtores de cianotoxinas fez-se por PCR convencional para as amostras com resultados positivos para o fragmento do gene produtor da ficocianina.

Na detecção de genes produtores de microcistina usaram-se os pares de *primers* descritos na tabela 6. Para amplificação destes genes as condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos com a temperatura de *annealing* (*Ta*) respetiva, como indicado na tabela 6 (hibridação), e 60 segundos a 72°C (extensão), finalmente seguiu-se a extensão final de 7 minutos a 72°C, ficando depois em pausa indefinida a 10°C. A composição do *mix* de reação encontra-se descrita na tabela 7.

**Tabela 6.** Pares de *primers* utilizados para a detecção dos genes produtores de microcistina.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>mcyB</i>	2156-F	ATCACTTCAATCTAACGACT	52	955	Mikalsen <i>et al.</i> , 2003
	3111-R	AGTTGCTGCTGTAAGAAA			
<i>mcyC</i>	PSCF1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	52	674	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PSCR1	CCGACAACATCACAAAGGC			
<i>mcyD</i>	PKDF1	GACGCTCAAATGATGAAAC	52	647	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKDR1	GCAACCGATAAAAACTCCC			
	PKDF2	AGTTATTCTCCTCAAGCC	52	859	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKDR2	CATTCGTTCCACTAAATCC			
<i>mcyE</i>	PKEF1	CGCAAACCCGATTTACAG	52	755	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKER1	CCCCTACCATCTTCATCTTC			
<i>mcyG</i>	PKGF1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC	52	425	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKGR1	AATCGCTAAAACGCCACC			

Na detecção de genes produtores de neurotoxinas, nomeadamente anatoxina-a (gene *anaC*) e saxitoxina (gene *stxA*), usaram-se os pares de *primers* descritos na tabela 8.

A amplificação do gene produtor de anatoxina-a realizou-se com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 58°C (hibridação) e 45 segundos a 72°C (extensão), finalmente seguiu-se a extensão final de 5 minutos a 72°C, ficando depois em pausa indefinida a 10°C.

**Tabela 7.** Composição do *mix* de reação para os pares de *primers* MSF/MSR, 2156-F/3111-R, PSCF1/PSCR1, PKDF1/PKDR1, PKDF2/PKDR2, PKEF1/PKER1, PKGF1/PKGR1 (Ouahid *et al.*, 2005).

Componentes	Quantidades-base (µl)
Tampão 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75
dNTPs 10mM	0,5
Taq Polimerase	0,2
<i>Primer</i> 3pmol	0,3 (x2)
Amostra	4
H <sub>2</sub> O	16,45
Total	<b>25</b>

Para a amplificação do gene produtor de saxitoxina as condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a 94°C (desnaturação), 60 segundos a 58°C (hibrida o) e 2 minutos a 72°C (extensão), finalmente seguiu-se a extensão final de 5 minutos a 72°C, ficando depois em pausa indefinida a 10°C.

**Tabela 8.** Pares de *primers* utilizados para a detec o dos genes produtores de saxitoxina e anatoxina-a.

Gene	Par de <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Ta (�C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>stxA</i>	<i>stxA</i> F	AGGTCTTTGACTTGCATCCAA	58	602	Ledreux <i>et al.</i> , 2010
	<i>stxA</i> R	AACCGGCGACATAGATGATA			
<i>anaC</i>	<i>anaC-gen</i> F	CTGGTATTCAGTCCCCTCTAT	58	366	Rantala-Ylinen <i>et al.</i> , 2011
	<i>anaC-gen</i> R	CCCAATAGCCTGTCATCAA			

A composi o do *mix* de rea o para os pares de *primers stxAF/stxAR* e *anaC-genF/anaC-genR* encontra-se descrita na tabela 9.

**Tabela 9.** Composi o do *mix* de rea o para os pares de *primers stxAF/stxAR* e *anaC-genF/anaC-genR* (Ledreux *et al.*, 2010; Rantala-Ylinen *et al.*, 2011).

Componentes	Quantidades-base (µl)
Tampão 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1
dNTPs 10mM	0,5
Taq Polimerase	0,2
<i>Primer</i> 100µM	0,5(x2)
Amostra	4
H <sub>2</sub> O	10,8
Total	<b>20</b>

Para análise dos produtos amplificados recorreu-se a eletroforese em géis de agarose (1-2%) a uma voltagem constante de 100 V. Os géis foram revelados com SYBR<sup>®</sup> Safe (*Invitrogen*) ou brometo de etídeo (1 mg/1 ml), através de um transiluminador *Molecular Imager<sup>®</sup> - Gel Doc<sup>TM</sup> XR<sup>+</sup>* (*BioRad*).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

O registo dos parâmetros físico-químicos foi feito em todos os locais de amostragem, com a exceção de ST(Mi) em abril devido às condições ambientais apresentadas na altura. Os valores registados estão todos apresentados no anexo VI.

Na tabela 10 pode-se observar as médias para os parâmetros registados. Nas lagoas do CG(Mi), FN(Mi), PDR(Mi) e V(Mi) foi onde se observou maior concentração de clorofila *a*. Nestas mesmas lagoas e nas lagoas AR(Mi), A(Mi), ST(Mi), SB(Mi) e RS(Mi) foi onde se observou registos mais altos da temperatura da água. As lagoas com pH mais alcalino e valores mais elevados de condutividade são as A(Mi), CG(Mi), FN(Mi), PDR(Mi), ST(Mi) e V(Mi). Em geral, as lagoas onde se verificam maiores valores de temperatura, condutividade, pH e clorofila *a* são as lagoas mais eutróficas, nomeadamente A(Mi), CG(Mi), FN(Mi), PDR(Mi), ST(Mi) e V(Mi).

**Tabela 10.** Valores médios para os parâmetros físico-químicos registados nas amostragens mensais.

Lagoa	T(°C)	pH	Condutividade (µS/cm)	Chl- <i>a</i>
RS(Mi)	18,99	5,19	45,33	0,91
AR(Mi)	19,57	6,19	39,30	2,53
CN(Mi)	17,34	6,20	38,52	5,64
R(Mi)	16,02	6,47	35,49	2,99
EN(Mi)	16,47	6,51	37,01	10,12
SB(Mi)	19,01	6,57	40,67	7,43
FG(Mi)	17,45	6,76	47,76	2,26
ES(Mi)	16,79	6,87	45,95	3,53
A(Mi)	20,54	8,09	100,71	1,96
FN(Mi)	22,08	8,33	147,23	38,80
ST(Mi)	20,84	8,60	129,46	5,34
V(Mi)	20,21	8,82	124,83	17,62
CG(Mi)	19,37	8,98	102,13	15,30
PDR(Mi)	19,34	9,08	70,85	129,21

#### 3.2. OCORRÊNCIA, ISOLAMENTO E CULTURA DE CIANOBACTÉRIAS

Em todos os locais de amostragem foram encontradas cianobactérias, mas foi nas lagoas eutróficas que se encontrou maior diversidade de espécies. Na tabela 11 estão listadas as cianobactérias identificadas em todas as amostras observadas, bem como as

espécies que foram obtidas em cultura após isolamento. Além destas, foram observadas as espécies *Aphanothece sp.*, *Lyngbya sp.* e *Pseudanabaena sp.*, em amostras ambientais enriquecidas com meio.

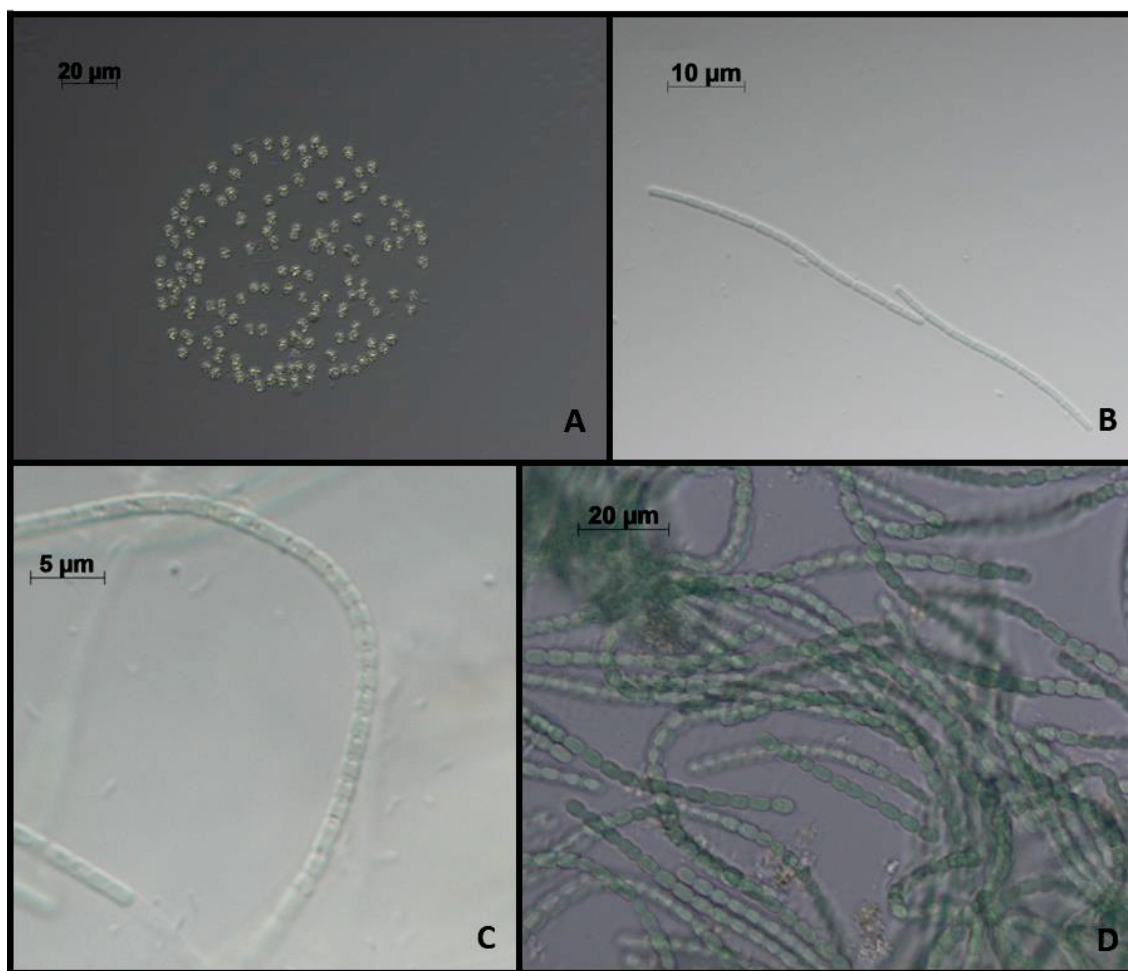
**Tabela 11.** Listagem de cianobactérias observadas e isoladas a partir de amostras ambientais de lagoas da ilha de São Miguel.

<b>Lagoas</b>	<b>Espécies observadas</b>	<b>Espécies em cultura</b>	<b>Técnica de isolamento</b>
<b>A(Mi)</b>	<i>Anabaena sp.</i> <i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis flos-aquae</i> <i>Pseudanabaena sp.</i> <i>Woronichinia naegeliana</i>	<i>Pseudanabaena sp.</i>	Isolamento em agar
<b>AR(Mi)</b>	<i>Eucapsis alpina</i> <i>Oscillatoria tenuis</i>		
<b>CG(Mi)</b>	<i>Anabaena sp.</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Oscillatoria tenuis</i> <i>Phormidium mucicola</i> <i>Pseudanabaena sp.</i> <i>Woronichinia naegeliana</i>		
<b>FG(Mi)</b>	<i>Lyngbya limnetica</i> <i>Oscillatoria tenuis</i>		
<b>PDR(Mi)</b>	<i>Anabaena sp.</i> <i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis flos-aquae</i> <i>Oscillatoria tenuis</i>		
<b>R(Mi)</b>	<i>Pseudanabaena sp.</i> <i>Planktolyngbya sp.</i>	<i>Pseudanabaena sp.</i>	Isolamento em agar
<b>FN(Mi)</b>	<i>Anabaena circinalis</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis flos-aquae</i> <i>Oscillatoria sp.</i> <i>Phormidium mucicola</i> <i>Planktolyngbya sp.</i> <i>Pseudanabeana sp.</i> <i>Woronichinia naegeliana</i>	<i>Microcystis flos-aquae</i>       <i>Planktolyngbya sp.</i>	Isolamento em microscópio invertido       Isolamento em agar
<b>RS(Mi)</b>	<i>Pseudanabaena sp.</i> <i>Chroococcus minutus</i> <i>Oscillatoria tenuis</i>		
<b>SB(Mi)</b>	<i>Anabaena sp.</i> <i>Pseudanabaena sp.</i>		

Tabela 11. Cont.

Lagoas	Espécies observadas	Espécies em cultura	Técnica de isolamento
ST(Mi)	<i>Aphanizomenon gracile</i>		
	<i>Microcystis flos-aquae</i>		
	<i>Pseudanabaena sp.</i>		
	<i>Planktolyngbya sp.</i>		
V(Mi)	<i>Anabaena sp.</i>		
	<i>Microcystis aeruginosa</i>		
	<i>Microcystis flos-aquae</i>		
	<i>Woronichinia naegeliana</i>		
	<i>Pseudanabaena sp.</i>		

Na figura 18 pode-se observar as espécies isoladas e cujas culturas foram utilizadas para análise molecular.



**Figura 18.** Fotografias de espécies de cianobactérias isoladas. **A:** *Microcystis flos-aquae* de FN(Mi); **B:** *Pseudanabaena sp.* de R(Mi); **C:** *Planktolyngbya sp.* de FN(Mi); **D:** *Pseudanabaena sp.* de A(Mi).

### 3.3. ANÁLISE MOLECULAR

#### 3.3.1. TESTES DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Na tabela 12 estão resumidos os resultados obtidos com o protocolo CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987), onde foi inicialmente testado o modo de obtenção do *pellet* ambiental. Para este protocolo os rácios de quantificação não estavam nos intervalos esperados ( $1,8 \geq 260/280 \leq 2$ ).

**Tabela 12.** Resultados obtidos após extração com o protocolo CTAB. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Amostra	Obtenção <i>pellet</i>	Quantificação		PC-IGS		
		DNA (ng/μl)	260/ 280	PCβ-F/ PCα-R	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
FN(Mi)	Centrifugação	16,6	2,47	+	+	-
FN(Mi)	Centrifugação	8,30	2,64	+	-	-
FN(Mi)	Filtração	28,8	2,08	+	-	-
V(Mi)	Filtração	10,3	2,11	-	-	-
A(Mi)	Filtração	5,10	2,14	-	-	-

Na tabela 13 estão resumidos os resultados obtidos com o protocolo *PureLink™ Plant, Total DNA Purification Kit - Invitrogen*, onde foram testados vários volumes para centrifugação e obtenção do *pellet* ambiental para extração.

**Tabela 13.** Resultados da extração de DNA com o kit *PureLink™ Plant*. -: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada.

Amostra	Obtenção <i>pellet</i>	Quantificação		PC-IGS		
		DNA (ng/μl)	260/ 280	PCβ-F/ PCα-R	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
V(Mi)	2 ml Centrifugação	18,4	1,83	+	+	-
A(Mi)	2 ml Centrifugação	5,7	2,55	+	+	-
V(Mi)	5,5 ml Centrifugação	6,0	1,59	+	+	-
A(Mi)	5,5 ml Centrifugação	1,3	5,22	+	x	x
V(Mi)	30 ml Centrifugação	16,4	1,65	+	+	-
A(Mi)	30 ml Centrifugação	8,3	1,59	-	-	-

O protocolo *DNeasy® Plant mini kit – Qiagen*, foi também testado e os resultados estão apresentados na tabela 14.



**Tabela 14.** Resultados obtidos com o kit DNeasy®Plant. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Amostra	Obtenção <i>pellet</i>	Quantificação		PC-IGS		
		DNA (ng/μl)	260/ 280	PCβ-F/ PCα-R	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
FN(Mi)	Centrifugação	4,4	1,42	+	-	-
FN(Mi)	Centrifugação	12,5	1,75	+	-	-

Os resultados do último protocolo testado, para extração de DNA, adaptado de Singh *et al.* (2011), estão resumidos na tabela 15.

**Tabela 15.** Resultados obtidos com o protocolo adaptado de Singh *et al.* (2011). -: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada.

Amostra	Obtenção <i>pellet</i>	Quantificação		PC-IGS		
		DNA (ng/μl)	260/ 280	PCβ-F/ PCα-R	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
V(Mi)	Centrifugação	34,8	1,72	-	-	-
A(Mi)	Centrifugação	13,4	1,38	+	+	-
PLFN*	Centrifugação	53,2	1,95	+	x	x
R(Mi)	Centrifugação	59,9	1,80	+	x	x

\**Planktolyngbya sp.* isolada de FN(Mi)

### 3.3.2. DETEÇÃO DOS GENES DE FICOCIANINAS E CIANOTOXINAS NAS AMOSTRAS MENSAIS

Os resultados quantitativos e qualitativos da extração de DNA das amostras mensais estão apresentados na tabela 16.

**Tabela 16.** Resultados após extração de DNA das amostras colhidas mensalmente: quantificação e determinação da qualidade do DNA extraído; amplificação do par de *primer cpcB-A*. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Mês	Lagoa	Quantificação		PC-IGS
		DNA (ng/μl)	260/280	PCβ-F/PCα-R
março	R(Mi)	4,9	2,15	-
	CN(Mi)	5,3	1,80	-
	EN(Mi)	11,0	1,41	-
	ES(Mi)	14,7	1,64	-
	RS(Mi)	21,4	1,50	-
	ST(Mi)	30,5	1,91	+
	V(Mi)	34,8	1,72	-
	A(Mi)	13,4	1,38	+

Tabela 16. Cont.

Mês	Lagoa	Quantificação		PC-IGS
		DNA (ng/μl)	260/280	PCβ-F/ PCα-R
abril	R(Mi)	15,3	2,21	+
	CN(Mi)	17,4	1,93	-
	EN(Mi)	113,8	1,45	-
	ES(Mi)	86,6	1,53	-
	V(Mi)	58,7	1,82	+
	A(Mi)	25,2	1,84	-
	RS(Mi)	54,4	1,85	-
	FN(Mi)	68,3	1,74	-
	SB(Mi)	33,7	1,82	+
	CG(Mi)	60,7	1,84	+
	AR(Mi)	81,7	1,70	-
	PDR(Mi)	134,9	1,84	-
	FG(Mi)	72,7	1,90	-
	maio	R(Mi)	35,8	1,96
CN(Mi)		74,5	1,86	-
EN(Mi)		20,9	1,78	-
ES(Mi)		149,2	2,17	-
V(Mi)		64,3	1,90	+
A(Mi)		135,4	1,79	-
ST(Mi)		39,5	1,93	+
RS(Mi)		17,8	1,84	-
FN(Mi)		73,7	1,78	-
SB(Mi)		28,3	1,58	+
CG(Mi)		52,3	2,15	-
AR(Mi)		11,8	1,65	-
PDR(Mi)		197,2	2,04	-
FG(Mi)		8,2	1,54	+
junho	R(Mi)	14,7	1,42	-
	CN(Mi)	17,5	1,56	-
	EN(Mi)	14,2	1,54	-
	ES(Mi)	45,5	1,89	-
	V(Mi)	9,9	1,60	+
	A(Mi)	10,3	1,76	+
	RS(Mi)	9,6	1,68	-
	ST(Mi)	11,7	1,70	+
	FN(Mi)	13,7	2,08	+
	SB(Mi)	66,0	1,89	-
	CG(Mi)	140,9	1,57	-
	AR(Mi)	26,5	1,78	-
	PDR(Mi)	9,4	1,77	+
	FG(Mi)	16	1,81	-

Tabela 16. Cont.

Mês	Lagoa	Quantificação		PC-IGS
		DNA (ng/μl)	260/280	PCβ-F/PCα-R
julho	R(Mi)	11,9	2,27	-
	CN(Mi)	27,1	2,4	-
	EN(Mi)	25,7	2,07	-
	ES(Mi)	5,1	2,28	-
	V(Mi)	10,9	2,63	+
	A(Mi)	12,8	2,29	+
	ST(Mi)	23,1	2,97	-
	RS(Mi)	28,5	2,35	-
	FN(Mi)	83,5	2,15	-
	SB(Mi)	30,5	2,03	-
	CG(Mi)	17,4	2,17	+
	AR(Mi)	30,9	2,32	-
	PDR(Mi)	37,2	1,87	+
	FG(Mi)	46,8	2,53	-

Na tabela 17 estão resumidos os resultados para a amplificação dos genes produtores de microcistinas nas amostras com resultado positivo para a presença do gene produtor de ficocianina.

Tabela 17. Amplificação dos genes produtores de microcistina. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Mês	Lagoa	<i>mcyB</i>	<i>mcyC</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>
		<i>2156F/111R</i>	<i>PSCF1/PSCR1</i>	<i>PKDF1/PKDR1</i>	<i>PKDF2/PDKR2</i>	<i>PKEF1/PKER1</i>	<i>PKGFI/PKGR1</i>
março	ST(Mi)	-	-	-	-	-	+
	A(Mi)	-	-	-	-	-	+
abril	R(Mi)	-	-	-	-	-	-
	V(Mi)	-	-	-	-	-	-
	SB(Mi)	-	-	-	-	-	-
	CG(Mi)	-	-	-	-	+	-
maio	V(Mi)	-	-	-	-	-	-
	ST(Mi)	-	-	+	-	-	+
	SB(Mi)	-	-	-	-	-	-
	FG(Mi)	-	-	-	-	-	-
junho	V(Mi)	-	+	+	-	+	+
	A(Mi)	-	-	+	-	+	+
	ST(Mi)	-	-	-	-	-	-
	RS(Mi)	-	-	-	-	-	-
	FN(Mi)	-	+	+	-	+	+
	PDR(Mi)	-	-	-	-	-	-
julho	V(Mi)	-	-	-	-	-	-
	A(Mi)	-	-	+	-	-	-
	CG(Mi)	-	-	-	-	-	-
	PDR(Mi)	-	-	-	-	-	-

Na tabela 18 estão resumidos os resultados para a amplificação dos genes produtores de saxitoxina e anatoxina-a.

**Tabela 18.** Amplificação dos genes produtores de neurotoxinas. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Mês	Lagoa	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
março	ST(Mi)	-	-
	A(Mi)	+	-
abril	R(Mi)	-	-
	V(Mi)	-	-
	SB(Mi)	-	-
	CG(Mi)	-	-
maio	V(Mi)	-	-
	ST(Mi)	+	-
	SB(Mi)	-	-
	FG(Mi)	-	-
junho	V(Mi)	-	-
	A(Mi)	+	-
	ST(Mi)	+	-
	RS(Mi)	-	-
	FN(Mi)	-	-
julho	PDR(Mi)	-	-
	V(Mi)	-	-
	A(Mi)	-	-
	CG(Mi)	-	-
	PDR(Mi)	-	-

### 3.3.3. DETECÇÃO DOS GENES DE FICOCIANINAS E CIANOTOXINAS NOS ISOLADOS

Do mesmo modo que para as amostras ambientais, após a extração de DNA dos isolados fez-se a quantificação de DNA por espectrofotometria (tabela 19). Contrariamente ao esperado, nem todas as amostras tiveram resultados positivos na amplificação do fragmento do gene produtor da ficocianina (tabela 19).

**Tabela 19.** Resultados da amplificação do gene produtor de ficocianinas nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação do gene; +: gene amplificado.

Isolado	Espécie	Lagoa	Quantificação		PC-IGS
			DNA (ng/μl)	260/280	PCβ-F/PCα-R
SMG-LRSD-141	<i>Pseudanabaena sp.</i>	R(Mi)	55,3	1,90	-
SMG-LF-141	<i>Planktolyngbya sp.</i>	FN(Mi)	68,0	2,00	-
SMG-LA-141	<i>Pseudanabaena sp.</i>	A(Mi)	156,9	1,94	+
SMG-LF-142	<i>Microcystis flos-aquae</i>	FN(Mi)	78,1	1,95	+

A amplificação dos genes produtores de toxinas foi realizado em todos os isolados. Os resultados para a amplificação dos genes produtores de microcistina e neurotoxinas (saxitoxina e anatoxina-a) são apresentados nas tabelas 20 e 21, respectivamente.

**Tabela 20.** Resultados da amplificação dos genes produtores de microcistina nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação do gene.

Isolado	<i>mcyB</i>	<i>mcyC</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>
	<i>2156F/111R</i>	<i>PSCF1/PSCR1</i>	<i>PKDF1/PKDR1</i>	<i>PKDF2/PDKR2</i>	<i>PKEF1/PKER1</i>	<i>PKGFI/PKGR1</i>
<b>SMG-LRSD-141</b>	-	-	-	-	-	-
<b>SMG-LF-141</b>	-	-	-	-	-	-
<b>SMG-LA-141</b>	-	-	-	-	-	-
<b>SMG-LF-142</b>	-	-	-	-	-	-

**Tabela 21.** Resultados da amplificação dos genes produtores de neurotoxinas nos isolados de cianobactérias. -: sem amplificação; +: gene amplificado.

Isolado	<i>stxA</i>	<i>anaC-gen</i>
<b>SMG-LRSD-141</b>	-	-
<b>SMG-LF-141</b>	+	-
<b>SMG-LA-141</b>	-	-
<b>SMG-LF-142</b>	+	-

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. OTIMIZAÇÃO E ESCOLHA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A otimização de protocolos e metodologias das técnicas moleculares é extremamente importante, uma vez que a extração de DNA genômico de cianobactérias é um processo complicado (Singh *et al.*, 2011). Tratando-se de organismos procariotas gram-negativos, que como tal possuem, para além de membrana celular, uma parede de peptidoglicano (Vincent, 2009), e em algumas espécies existe uma bainha polissacarídea no exterior da parede celular (Garcia-Pichel, 2009; Singh *et al.*, 2011), como em *Lyngbya sp.* (Garcia-Pichel, 2009), o que dificulta a lise celular. Para ultrapassar estas dificuldades procurou-se, numa primeira abordagem, a otimização de um protocolo que permitisse a extração de DNA direta das amostras de água. Foram testados quatro protocolos de extração de DNA (dois protocolos com CTAB e dois kits) e duas formas de obtenção do *pellet* ambiental para a extração: por centrifugação e por filtração.

Uma vez que a obtenção do *pellet* ambiental por centrifugação mostrou ser uma técnica mais rápida, fácil e menos dispendiosa (não requer o uso de filtros), para além de que a quantidade de água necessária é menor (quando em comparação com a filtração) e que os resultados da quantificação das amostras após a extração foram muito semelhantes (ver tabela 12), escolheu-se a centrifugação como modo de obtenção do *pellet* ambiental. Esta metodologia de obtenção do *pellet* ambiental para posterior extração e análise molecular foi também a eleita noutros trabalhos similares (e.g. Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Foram também testadas várias quantidades de água para a otimização do volume a centrifugar para a extração e uma vez que os resultados não foram consistentes para os três volumes testados (ver tabela 13) optou-se centrifugar 2 ml de amostra ambiental por cada local de amostragem.

A metodologia escolhida para a extração de DNA diretamente de amostras de água, após centrifugação, foi o protocolo adaptado de Singh *et al.* (2011). Este protocolo, com base no detergente CTAB, desenhado e otimizado para a extração de DNA de cianobactérias, mostrou-se mais eficaz que os restantes protocolos testados, uma vez que os valores dos rácios para a quantificação de DNA foram os melhores (tabela 22). O protocolo de Singh *et al.* (2011) foi, no entanto, adaptado às necessidades das amostras e foi sendo reajustado ao longo do trabalho.

**Tabela 22.** Quantificação de DNA e valores médios para os protocolos testados.

<b>Protocolo</b>	<b>Amostras</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>	<b>260/280</b>
Doyle & Doyle, 1987 (adaptado)	5	13,82	2,288
<i>PureLink™ Plant</i>	6	9,35	2,405
<i>DNeasy® Plant mini kit</i>	2	8,45	1,585
Singh <i>et al.</i> , 2011 (adaptado)	4	40,325	<b>1,713</b>

Singh *et al.* (2011) obtiveram bons resultados, com rácios dentro dos valores ótimos e boas quantidades de DNA (200-500 ng/μl) para a extração de DNA em isolados. Neste trabalho os resultados da extração não são comparáveis com os de Singh *et al.* (2011) pois, ao contrário destes, foram testadas apenas amostras ambientais, onde são esperadas menores quantidades de DNA do que em isolados (menor biomassa de organismos). Os protocolos de extração deveriam ter sido testados inicialmente em isolados, no entanto, devido à criação e otimização de protocolos para o isolamento de cianobactérias não foi possível obter isolados no início do trabalho.

Outros autores como Bittencourt-Oliveira *et al.* (2010), Morin *et al.* (2010), Murray *et al.* (2011), Rastogi *et al.* (2014b) e Wilson *et al.* (2000) usam outros protocolos com o detergente CTAB em amostras ambientais para a extração de DNA de cianobactérias. Nestes trabalhos os resultados foram relevantes, não havendo indícios da ineficácia dos protocolos com o detergente CTAB.

## **4.2. OCORRÊNCIA, ISOLAMENTO E CULTURA DE CIANOBACTÉRIAS**

Nas águas lacustres dos Açores já foram observadas e identificadas mais de 40 espécies de cianobactérias (Gonçalves, 2008; Moreira *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Santos & Santana, 2003, 2009; Santos *et al.*, 2001, 2004, 2005; 2008), algumas destas com potencialidade cianotóxica. Neste trabalho foram observadas e identificadas 16 espécies de cianobactérias, incluídas em 11 géneros, sendo que sete destas espécies estão descritas na literatura como produtoras de cianotoxinas (ver tabela 3): *Anabaena sp.* (ATX-a e MC), *Anabaena circinalis* (ATX-a, MC e STX), *Aphanizomenon sp.* (ATX-a e STX), *Aphanizomenon gracile* (MC e STX), *Microcystis aeruginosa* (ATX-a e MC), *Oscillatoria sp.* (ATX-a, CYN e MC) e *Oscillatoria tenuis* (MC).

Os resultados obtidos mostram que existe uma relação entre as características ambientais e a variedade de cianobactérias presentes nos locais amostrados, uma vez que, temperaturas mais elevadas provocam a proliferação celular e o aparecimento de *blooms*

(Merel *et al.*, 2013; Paul, 2008), águas com pH mais elevados são resultantes do aumento da taxa fotossintética (Gonçalves, 2008) e a concentração de clorofila *a* é um indicador da biomassa fitoplanctónica (Merel *et al.*, 2013). As lagoas onde foi observada maior diversidade de espécies de cianobactérias foram as lagoas mais eutróficas (SRAM, 2013; Santos e Santana, 2009), nomeadamente as lagoas: Azul, Verde, das Furnas e do Congro. Em geral, foi nestas lagoas onde foram registados os valores mais altos de temperatura, pH, condutividade e clorofila *a*.

O isolamento de cianobactérias a partir de amostras ambientais tinha como objetivo inicial a obtenção de culturas puras para posterior extração de DNA, de modo a fazer-se a relação entre a presença de genes produtores de toxinas e as espécies de cianobactérias presentes nas lagoas. No entanto, como as condições de isolamento e cultura tiveram que ser criadas e otimizadas, não foi possível obter culturas puras de todos os locais de amostragem, nem de todas as espécies observadas (ver tabela 11).

Inicialmente foi feito o isolamento em agar, que se mostrou eficaz para o isolamento de cianobactérias filamentosas (*Pseudanabaena sp.* e *Planktolyngbya sp.*), mas o mesmo não se pode afirmar para o isolamento de cianobactérias unicelulares e coloniais (e.g. *Microcystis*), uma vez que estas crescem em agar de forma dispersa dificultando o seu isolamento. A colocação da amostra ambiental diretamente em agar permitiu o crescimento de outros organismos para além de cianobactérias, o que poderá também ter dificultado a observação e isolamento de espécies de menores dimensões. Como o isolamento em agar não foi eficaz para a obtenção de isolados de espécies coloniais que se sabia estarem presentes nas amostras (e.g. *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *W. naegeliana*) e que eram potencialmente produtoras de toxinas, recorreu-se a outra metodologia de isolamento: a microscopia invertida. Esta técnica permitiu o isolamento de espécies de cianobactérias coloniais e filamentosas de forma mais rápida, uma vez que permite a observação e o isolamento direto. No entanto, esta metodologia também mostrou ter limitações. A colocação dos inóculos diretamente da amostra ambiental para o meio de cultura, que foi realizada para ser mais rápida e eficaz, retira o tempo de adaptação dos organismos, podendo interferir com a capacidade de adaptação dos mesmos e até provocar a sua morte (Rippka, 1981).

Devido à adaptação destas metodologias e às limitações das mesmas, no decurso deste trabalho foi apenas possível obter quatro culturas puras de cianobactérias: três de espécies filamentosas obtidas por isolamento em agar (*Pseudanabaena sp.* e *Planktolyngbya sp.*) e uma de uma espécie colonial (*M. flos-aquae*) obtida por isolamento



em microscopia invertida (ver tabela 11). Nenhuma das espécies obtidas em cultura está descrita na literatura científica como produtora de toxinas, no entanto, foi realizado na mesma a análise molecular dos genes produtores de cianotoxinas, uma vez que poderiam estar presentes estirpes diferentes nas lagoas estudadas.

### **4.3. DETEÇÃO DOS GENES DE FICOCIANINAS E CIANOTOXINAS**

#### **4.3.1. AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Foram analisadas molecularmente 63 amostras de quatro meses de amostragem em 14 lagoas (incluindo amostras de oito lagoas no mês de março). Em 19 das 63 amostras foi detetado o fragmento do gene da ficocianina, sendo que em oito destas amostras foi detetado o gene produtor de microcistina e em quatro o gene produtor de saxitoxina. O gene produtor de anatoxina-a não foi detetado em qualquer amostra.

As ficocianinas são pigmentos fotossintéticos presentes em todas as cianobactérias (Bermejo, 2014) e por esta razão o locus genético PC-IGS é muito utilizado para a confirmação molecular da presença de DNA de cianobactérias em amostras ambientais (e.g. Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2009; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2002). Nas lagoas do Areeiro, do Canário, das Empadadas Norte, das Empadadas Sul e Rasa das Sete Cidades não se verificou a amplificação do fragmento do gene da ficocianina, algo que em parte já era esperado uma vez que as cianobactérias são pouco abundantes nestas lagoas (e.g. Gonçalves 2008; Gonçalves *et al.* 2012, 2013). Apesar de não ter sido detetado o gene das ficocianinas nestas lagoas tal não significa em absoluto que estas não estão presentes e que não possa haver espécies produtoras de toxinas. Aliás, nas lagoas do Areeiro e Rasa das Sete Cidades foram observadas algumas espécies de cianobactérias (ver tabela 11) mas com biomassas bastante baixas como demonstram os valores de clorofila *a* nestas lagoas (entre 0,34 e 4,12 µg/l). Os baixos valores de biomassa fitoplanctónica nestas lagoas dominadas por comunidades bentónicas (Gonçalves 2008) pode não ter permitido a obtenção de extratos de DNA com quantidade suficiente para a ocorrência de amplificação. De facto, nas amostras de março das lagoas do Canário (3,2 ng/µl) e Empadadas Norte (5,7 ng/µl) e de julho de Empadadas Sul (5,1 ng/µl) a pouca quantidade de DNA extraído pode ter sido a razão pela qual não ocorreu amplificação. A quantidade mínima de DNA em que se observou amplificação foi de 8,2 ng/µl na amostra de maio da lagoa do Fogo.

Nas lagoas do Fogo, Pico D’el Rei, Rasa da Serra Devassa e São Brás foi possível detetar o fragmento do gene da ficocianina, no entanto não se observou amplificação dos genes produtores de microcistina com nenhum dos pares de *primers* utilizados. Uma vez mais estes resultados vão ao encontro do que era esperado, pois à exceção da lagoa do Pico D’el Rei onde foi observada *M. flos-aquae*, nestas lagoas não foram observadas cianobactérias potencialmente produtoras de MCS. Em trabalhos anteriores (e.g. Gonçalves 2008) também não foram observadas nestas lagoas cianobactérias produtoras de MCs em abundâncias significativas. No caso da lagoa do Pico D’el Rei, a ausência de amplificação do gene das MCs poderá estar relacionada com as características das estirpes presentes ou pelo facto de não haver amplificação do gene por falta de especificidade do par de *primer* utilizado. A não deteção de MCs nas amostras desta lagoa pode também estar relacionada com dificuldades na extração de DNA ou pela presença de contaminantes, na amostra ambiental, inibidores de PCR.

O gene *cluster mcy* é responsável pela produção de MCs (Neilan *et al.*, 2008; Tillett *et al.*, 2000) e uma vez que o uso de mais que um par de *primer* permite deduzir melhor a potencialidade cianotóxica (Ouahid *et al.*, 2005) foram utilizados vários pares de *primers* capazes de amplificar os genes *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* do mesmo *cluster*. Desta forma foi possível detetar estes genes na lagoa Azul, Verde, do Congro, das Furnas e de Santiago. Segundo Moreira *et al.* (2011), a presença de um único gene produtor de microcistina não é indicador da potencialidade tóxica, uma vez que por vezes a presença de um gene é também observada em espécies não produtoras. Nas amostras testadas, apenas na lagoa do Congro se observou amplificação de um único gene produtor de MCs (*mcyE*) e por esta razão, não é possível afirmar que existe uma potencialidade cianotóxica nesta lagoa. Como nas restantes lagoas em que se detetaram genes produtores de MCs foi sempre amplificado mais do que um gene por amostra é possível dizer que nas lagoas Azul, Verde, Santiago e Furnas existe a potencialidade para a produção de microcistinas. Neste trabalho reporta-se a primeira deteção de genes produtores de MC na lagoa Verde e na lagoa de Santiago.

Segundo os relatórios da monitorização de águas lagunares dos Açores e estudos de toxicidade de cianobactérias nestas águas, foi confirmada a presença de MCs por HPLC nas seguintes lagoas: lagoa das Furnas (Santos & Santana, 2009; Santos *et al.*, 2001, 2004, 2012), lagoa Azul, lagoa Verde (Santos & Santana, 2009; Santos *et al.*, 2004, 2005, 2012), lagoa do Congro, lagoa de São Brás, lagoa do Canário e lagoas das Empadadas (Santos & Santana, 2009). Com a exceção da lagoa de Santiago (nunca antes

testada quanto à presença e/ou potencialidade da produção de cianotoxinas), em todas as lagoas que se detetaram genes produtores de MCs já havia sido observada a presença destas toxinas por HPLC. Nas lagoas das Empadadas, do Canário e de São Brás embora já tivesse sido detetada a presença de MCs (por HPLC), neste trabalho não foi verificada a presença de genes produtores das mesmas, o que poderá estar relacionado com variações sazonais ou interanuais, ou mesmo com a baixa abundância das espécies produtoras nas amostras analisadas.

Assim como as MCs, a produção da STX é devida a um gene *cluster* (*stx*). Neste trabalho usou-se o par de *primer* que permite amplificar parcialmente o gene *stxA* (Kellman *et al.*, 2008). A deteção do potencial de produção da STX só foi verificada nas lagoas Azul e de Santiago, onde houve amplificação do gene *stxA*. Nestas lagoas foram também identificadas espécies de cianobactérias potencialmente produtoras desta toxina nomeadamente *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon sp.* e *Aphanizomenon gracile* (ver tabela 11). Assim, neste trabalho reporta-se a primeira deteção do gene *stxA* e a potencialidade para a produção de saxitoxinas na lagoa Azul e na lagoa de Santiago, uma vez que nos Açores esta toxina nunca havia sido detetada.

O gene *anaC* codifica a proteína responsável pela iniciação da síntese da anatoxina-a (Rantala-Ylinen *et al.*, 2011) e por esta razão foi utilizado o par de *primer* que amplifica este gene. Este gene não foi amplificado em nenhuma das amostras ambientais estudadas, o que sugere que não existe potencial para a produção desta neurotoxina nas lagoas estudadas. Embora não tenha havido amplificação do gene *anaC*, espécies potencialmente produtoras de anatoxinas (e.g. *Anabaena circinalis* e *Microcystis aeruginosa*) foram observadas em várias lagoas (ver tabela 11). A não amplificação do gene produtor de anatoxina-a pode ser explicada pela ausência do gene na amostra ambiental, pela existência de estirpes não produtoras, pela baixa biomassa de cianobactérias presentes (pouco DNA), pela especificidade do par de *primer* ou ainda devido ao processo de extração de DNA.

Os resultados mostram que existe um potencial de produção de cianotoxinas nas lagoas Azul, Verde, de Santiago e das Furnas, não apenas de microcistina, mas também de saxitoxina.

As técnicas utilizadas mostraram ser úteis e apropriadas para a deteção do potencial de produção de cianotoxinas em amostras ambientais das lagoas de São Miguel (Açores). Em trabalhos semelhantes Al-Tebrineh *et al.* (2010), Bittencourt-Oliveira *et al.* (2009), Bittencourt-Oliveira *et al.* (2010), Fergusson & Saint (2000), Hurtado-Alarcón &

Polanía-Vorenberg (2014), Lee *et al.* (2015), Mankiewicz-Boczek *et al.* (2006), Ouahid *et al.* (2005), Rantala-Ylinen *et al.* (2011), Saker *et al.* (2007) e Zhang *et al.* (2014) chegaram à mesma conclusão, de que as técnicas moleculares são essenciais para a previsão da produção de toxinas e devem ser incluídos em programas de monitorização da qualidade de massas de água.

#### 4.3.2. ISOLADOS

Os isolados de cianobactérias obtidos em culturas puras foram analisados molecularmente e ao contrário do esperado nem todos os isolados tiveram resultados positivos para a amplificação do gene da ficocianina (PC-IGS). Nos isolados SMG-LRSD-141 e SMG-LF-141, *Pseudanabaena sp.* da lagoa Rasa e *Planktolyngbya sp.* da lagoa das Furnas, respetivamente, não se observou amplificação deste gene o que poderá ser explicado pela variabilidade do locus genético PC-IGS (Dyble *et al.*, 2002), i.e., o par de *primer* utilizado para amplificação deste gene pode não ser específico para todas as espécies que se encontram nas lagoas estudadas (Neilan *et al.*, 1995).

Os isolados obtidos em cultura pura não estão descritos na literatura como produtores de cianotoxinas (ver tabela 3). Em conformidade com isto, não foram detetados os genes produtores de MC e ATX-a em nenhum dos isolados. Pelo contrário, nos isolados SMG-LF-141 e SMG-LF-142 foi amplificado um gene produtor de STX (*stxA*). Como estas espécies não estão descritas como potenciais produtoras de cianotoxinas, seria necessário fazer a confirmação da amplificação do gene *stxA*. Esta confirmação passaria por sequenciar o gene amplificado para posteriormente comparação com a sequência descrita para o mesmo.

#### 4.4. RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE GENES PRODUTORES DE CIANOTOXINAS E AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A temperatura e a luz têm impactos no crescimento de cianobactérias, bem como na formação de *blooms* com potencialidades tóxicas, i.e., temperaturas mais elevadas e luz mais intensa podem induzir a proliferação celular e influenciar a produção de cianotoxinas (Jeppesen *et al.*, 2009; Kosten *et al.*, 2012; Merel *et al.*, 2013; Paul, 2008; Sivonen, 1990). Tal como esperado foi nos meses mais quentes que as temperaturas

registadas foram mais elevadas e tendo em conta que as amostragens foram realizadas de abril a julho, as temperaturas médias foram mais elevadas do que as temperaturas médias anuais descritas por Pereira *et al.* (2014) (ver tabela 4 e tabela 10).

Trabalhos anteriores realizados em lagoas açorianas (Santos & Santana, 2003, 2009; Santos *et al.*, 2012) mostraram que a concentração de MC-LR é maior nos meses de fevereiro, julho e outubro, não evidenciando uma relação direta com os valores de temperatura registados no momento da colheita das amostras. No entanto, estes trabalhos apenas foram realizados durante os meses de fevereiro, maio, julho, outubro e novembro. Neste trabalho, observando os registos de temperatura e os resultados moleculares, não é possível afirmar que a temperatura tenha um efeito direto na presença de genes produtores de toxinas nas águas superficiais dos Açores.

Outros parâmetros como o pH e a condutividade mostraram valores médios idênticos às médias anuais descritas por Pereira *et al.* (2014), o que demonstra a constância destes valores, tanto em termos sazonais como interanuais. O aumento do pH em águas lacustres com baixo poder tamponante, como são as águas das lagoas dos Açores (Gonçalves 2008), está relacionado com o aumento da taxa fotossintética e consequentemente com a redução da concentração de CO<sub>2</sub>. Em lagoas profundas, com maior abundância de fitoplâncton, o pH é tendencialmente mais elevado do que em lagoas pouco profundas, que têm maior abundância de organismos bentónicos (Gonçalves, 2008). Efetivamente foi nas lagoas profundas com valores de pH e condutividade da água mais elevados (Azul, Verde, Santiago e Furnas) que foram detetados genes produtores quer de microcistinas quer de saxitoxinas.

A clorofila *a* é muito utilizada como parâmetro indicador da biomassa fitoplanctónica e pode ser usada como medida de estimação da presença de MCs intracelulares (Merel *et al.*, 2013; Meriluoto & Spoof, 2008). Nas 14 lagoas estudadas a concentração de clorofila *a* variou significativamente entre elas (com um mínimo de 0,34 µg/l observado em maio em RS(Mi) e um máximo de 342,23 µg/l em abril no PDR(Mi)) mas não ao longo do período em análise. Tal como com os outros parâmetros ambientais estudados, há uma relação entre a concentração de clorofila *a* e a presença de espécies produtoras de toxinas com um predomínio destas nas lagoas com maior biomassa fitoplanctónica.

Apesar do baixo número de amostras com resultados positivos para a presença de genes produtores de microcistinas, estas parecem ser mais frequentes em lagoas profundas e eutróficas, isto é, lagoas com pH mais elevado e maior biomassa

fitoplanctónica (concentração de clorofila *a*). Por outro lado, não parece haver uma relação em termos de sazonalidade entre as variáveis ambientais estudadas e a presença/ausência de genes produtores de cianotoxinas. No entanto, este resultado deve ser encarado com alguma reserva pois o curto período estudado não permite conclusões robustas relativamente ao comportamento sazonal das lagoas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho confirmou a necessidade de incorporação nas redes de monitorização da qualidade da água em lagoas açorianas da monitorização da produção de cianotoxinas, uma vez que através da análise molecular se confirmou a presença de genótipos produtores de toxinas nas lagoas Azul, Verde, Santiago e Furnas.

O protocolo utilizado mostrou-se eficaz para a deteção do potencial cianotóxico. Para além disto, a extração de DNA diretamente de amostras de água por centrifugação, mostrou-se rápida e económica. O protocolo de extração utilizado pode ser melhorado, nomeadamente com a introdução de um passo que permita a remoção de RNA (e.g. uso de RNase) e a otimização da remoção de proteínas e outros contaminantes (e.g. uso de SDS, isopropanol, etc.).

Os pares de *primers* utilizados para a amplificação de genes produtores de MC mostraram ser eficazes e poderão ser utilizados futuramente, o mesmo se aplica ao par de *primer* para a amplificação de genes produtores de STX, no entanto, podem ser introduzidos outros pares de *primers* que permitam esta amplificação, como *stxI*. O par de *primer* utilizado para a amplificação do gene *anaC*, pode não ser específico para as espécies presentes nas lagoas açorianas e por esta razão deveria ser testado outro par de *primer* para a amplificação deste gene, ou outro gene do gene *cluster ana*. O par de *primer* usado para a deteção do fragmento do gene produtor de ficocianina, mostrou não ser específico para todas as espécies e por esta razão, com recurso aos isolados obtidos, deveriam ser desenhados pares de *primers* específicos para a deteção, não só da região PC-IGS, como para os genes *clusters mcy, stx e ana*. Outra opção seria substituir a deteção da região PC-IGS e passar usar um par de *primer* que amplifique a região 16S rDNA partilhada por todas as cianobactérias (Moreira *et al.*, 2011).

O isolamento de espécimes de cianobactérias das amostras ambientais permitiu a estabelecer culturas que permitirão ajustar e otimizar os métodos moleculares. Futuramente deveria ser feita a sequenciação dos isolados obtidos, e de outros que se estão a isolar, de modo a verificar a divergência genética nas espécies presentes nos Açores, permitindo assim comparar não só as mesmas espécies nas diferentes lagoas, como comparar com resultados com outros trabalhos semelhantes. A sequenciação destes isolados também irá permitir desenhar pares de *primers* específicos e deste modo otimizar o protocolo molecular. Para além destas opções, os isolados deverão ser usados, futuramente, sempre em cada amplificação por PCR, como controlos positivos. Para isto

será necessário fazer a análise molecular a cada isolado e verificar a presença dos genes produtores de cianotoxinas, deste modo é possível também estabelecer a relação entre a presença do gene produtor e a(s) espécie(s) potencialmente produtora(s). Com pares de *primers* exclusivos para as espécies presentes nas lagoas de São Miguel seria possível desenhar um protocolo específico para a deteção do potencial cianotóxico nestas águas.

As metodologias para o isolamento de espécies de cianobactérias poderão ser otimizadas. Com as observações feitas ao longo do trabalho foi possível chegar à conclusão de que ambas as metodologias utilizadas (isolamento em agar e isolamento por microscopia invertida) são úteis e futuramente deverão ser usadas conjuntamente. Inicialmente deveria ser feita a adaptação da amostra em meio de cultura, i.e., colocar a amostra num *erlenmeyer* esterilizado com meio de cultura numa proporção 50:50 e só após um tempo de adaptação e crescimento deveria ser feito o isolamento por microscopia invertida (observação e isolamento direto). As condições de crescimento deveriam ser: fotoperíodo 14 horas (como utilizado), 2500-3000 LUX e temperatura a 25°C (tendo sempre em atenção o taxon a isolar, pois podem ser necessárias temperaturas diferentes). Quando necessário isolar espécies filamentosas deverão ser usadas placas de agar a 0,7% (<1,5%). Para o crescimento exponencial, os isolados deverão ser colocados em *erlenmeyers* com capacidade para volumes elevados e para manter as culturas deverão ser colocados em placas de agar e as condições de crescimento deverão ser mínimas para se manter um estado latente.

Para além das toxinas estudadas também deveria ser feito, futuramente, o estudo da potencialidade da produção de cilindrospermopsinas, uma vez que nas lagoas estudadas foram observadas espécies que são potenciais produtoras desta toxina, como *Oscillatoria sp.* e *Aphanizomenon sp.*.

Com o protocolo otimizado e dada a importância das metodologias moleculares, seria de elevado interesse incluir este tipo de estudo na monitorização regular da qualidade da água das lagoas açorianas, uma vez que seria possível prever a presença de cianotoxinas previamente à sua produção. As metodologias moleculares são essenciais para o *screening* inicial do potencial cianotóxico em massas de água, dado que são metodologias sensíveis, mais rápidas e mais económicas do que outras, podendo substituir técnicas mais dispendiosas nesta fase. No entanto, não permitem quantificar as toxinas presentes na água e por esta mesma razão devem ser complementares e acompanhadas de outras metodologias como biológicas, para a determinação da



composição, abundância, e comportamento das espécies, e analíticas, para a confirmação e quantificação das toxinas (e.g. HPLC, MALDI-TOF).

Face aos resultados obtidos, é recomendado realizar um estudo mais exaustivo da presença de genes produtores de cianotoxinas em águas lacustres dos Açores (abrangendo mais massas de água e mais toxinas) e futuramente incluir as metodologias moleculares nos sistemas de monitorização da qualidade das águas dos Açores, como sistemas de alerta de risco para a saúde ambiental e saúde pública.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Al-Tebrineh, J.; Mihali, T.; Pomati, F. & Neilan, B. (2010). Detection of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in Environmental Water Blooms by Quantitative PCR. *Appl Environ Microb*, **76**(23): 7836-7842.
- Apeldoorn, M.; van Egmond, V.; Speijers, G. & Bakker, G. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**: 7-60.
- Araóz, R.; Nghiêm, H-O.; Rippka, R.; Palibroda, N.; Tandeau de Marsac, N. & Herdman, M. (2005). Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*, **151**: 1263-1273.
- Bain, P.; Burcham, P.; Falconer, I.; Fontaine, F.; Froscio, S.; Humpage, A.; Neumann, C.; Patel, B.; Shaw, G. & Wickramasinghe, W. (2008). *Cylindrospermopsin mechanism of toxicity and genotoxicity*. Corporative Research Center for Water Quality and Treatment, Research Report, **61**: 1-75.
- Baker, J.; Entsch, B.; Neilan, B. & McKay, D. (2002). Monitoring Changing Toxicogenicity of a Cyanobacterial Bloom by Molecular Methods. *Appl Environ Microb*, **68**(12): 6070-6076.
- Baker, P. & Humpage, A. (1994). Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of Murray-Darling basin, Australia. *Aus J Mar Freshwat Res*, **45**: 773-786.
- Ballot, A.; Krienitz, L.; Kotut K.; Wiegand, C.; Metcalf, J.; Codd, G. & Pflugmacher, D. (2004). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya - Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *J Plankton Res*, **26**(8): 925-935.
- Banker, R.; Carmeli, S.; Hadas, O.; Teltsch, B.; Porat, R. & Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol*, **33**: 613-616.
- Barón-Sola, A.; Ouahid, Y. & del Campo, F. (2011). Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotox Environ Safe*, **75**: 102-108.
- Beattie, K.; Kaya, K.; Sano, T. & Codd, G. (1998). Three dehydrobutyrine (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc sp.* *Phytochemistry*, **47**: 1289-1292.
- Bernejo, R. (2014). Phycocyanins. In: Sharma, N.; Rai, A. & Stal, L. *Cyanobacteria an economic perspective*. 1ªEd. Reino Unido: Wiley Blackwell, 209-226.

- Bittencourt-Oliveira, M.; Piccin-Santos, V. & Gouvêa-Barros, S. (2010). Microcystin-Producing Genotypes from Cyanobacteria in Brazilian Reservoirs. *Environ Toxicol*, **27**(8):461-471.
- Bittencourt-Oliveira, M.; Santos, D. & Moura, N. (2009). Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using a molecular method. *Braz. J. Biol.*, **70**(4): 1005-1010.
- Bormans, M.; Brient, L.; Lengronne, M. & Duval, P. (2014). Cylindrospermopsin Accumulation and Release by the Benthic Cyanobacterium *Oscillatoria sp.* PCC 6506 under Different Light Conditions and Growth Phases. *Bull Environ Contam Toxicol*, **92**: 243-247.
- Botes, D.; Tuinman, A.; Wessels, P.; Viljoen, C.; Kruger, H.; Williams, D.; Santikarn, S.; Smith, R. & Hammond, S. (1984). The structure of cyanoginosins-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Soc Perkin Trans*, **1**: 2311-2318.
- Brittain, S.; Mohamed, Z.; Wang, J.; Lehmann, V.; Carmichael, W. & Rinehart, K. (2000). Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*, **38**: 1759-1771.
- Bruno, M.; Barbini, D.; Pierdominici, E.; Serse, A. & Ioppolo, A. (1994). Anatoxin-a and previously unknown toxin in *Anabaena planktonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon*, **32**(3): 369-373.
- Campos, A. & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci*, **11**: 268-287.
- Carmichael, W. (1994). The Toxins of Cyanobacteria, *SCI AM*, **270**: 78-86.
- Carmichael, W. (2008). A world view - One-hundred twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria - Where do we go from here? In: Hudnell, H. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1<sup>a</sup>Ed., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 105-120.
- Carmichael, W.; Beasley, V.; Bunner, D.; Eloff, J.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K.; Krishnamurthy, T.; Min-Juan, Y.; Moore, R.; Rinehart, K.; Runnegar, M.; Skulberg, O. & Watanabe, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, **26**: 971-973.
- Carmichael, W.; Evans, W.; Yin, Q.; Bell, P. & Moczydlowski, E. (1997). Evidence of paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 3104-3110.

- Carmichael, W. & Li, R. (2006). Cyanobacterial toxins in the Salton Sea. *Saline Ecosyst*, **2** (5): 10.1186/1746-1448-2-5.
- Catterall, W. (2000). From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, **26**: 13-25.
- Chorus, I.; Falconer, I.; Salas, H. & Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Jpn J Tox Env Health*, **3**: 323-347.
- Chorus, I. & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: F & FN Spon, WHO, 400.
- Codd, G. & Beattie K. (1991). Cyanobacteria (blue-green alga) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom. *PHLS, Suplemento - Microbiology Digest*, **8**: 82-86.
- Cohen, Y. & Gurevitz, M. (2006). The Cyanobacteria - Ecology, Physiology and Molecular Genetics. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. & Stackebrandt, E. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3<sup>a</sup> Ed., Vol. 4. Nova Iorque: Springer, 1074-1098.
- Cohen, Y.; Jorgensen, B; Revsbech, N. & Poplawski. R. (1986). Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, **51**(2): 398-407.
- Costa, I.; Azevedo, S.; Senna, P.; Bernardo, R.; Costa, S. & Chellappa, N. (2006). Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz J Biol*, **66**: 211-219.
- Cupples, A.; Xagorarakis, I. & Rose, J. (2010). New molecular methods for detection of waterborne pathogens. In: Mitchell, R. & Gu, J-D. *Environmental Microbiology*. 2<sup>a</sup>Ed. EUA: Wiley-Blackwell, 57-94.
- Cymbron, R.; Pacheco, D.; Cruz, J.; Gonçalves, V.; Cabral, M.; Raposeiro, P.; Costa, A.; Marques, H.; Domingos, M. & Lima, M. (2008). *Monitorização da qualidade das águas interiores das ilhas do Pico, Faial, Flores e Corvo da Região Autónoma dos Açores*. Projeto Aquamac – Pela gestão sustentável da Água na Macaronésia. Projecto INTERREG III B Açores-Madeira-Canárias. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Direção Regional do Ordenamento do Território e Recursos Hídricos.
- Cymbron, R.; Pacheco, D.; Gonçalves, V.; Cabral, M.; Cruz, J., Raposeiro, P.; Costa, A.; Marques, H.; Domingos, M.; Nunes, J. & Coutinho, R. (2005). *Monitorização da qualidade das águas interiores das ilhas de Santa Maria e São Miguel da Região*

*Autónoma dos Açores*. Projeto Aquamac – Pela gestão sustentável da Água na Macaronésia. Projecto INTERREG III B Açores-Madeira-Canárias. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Direção Regional do Ordenamento do Território e Recursos Hídricos.

- Davis, T.; Berry, D.; Boyer, G. & Gobler, C. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, **8**: 715-725.
- Dauphard, J. *et al.* (2014). Anatoxin: Chemistry, Effects, Source, Metabolism, and Detection. In: Botana, L. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 1ªEd. Boca Raton: CRC Press, 1061-1071.
- de la Cruz, A.; Hiskia, A.; Kaloudis, T.; Chernoff, N.; Hill, D.; Antoniou, M.; He, X.; Loftin, K.; O'Shea, K.; Zhao, C.; Pelaez, M.; Han, C.; Lynch, T. & Dionysiou, D. (2013). A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci*, **15**: 1979-2003.
- Dittmann, E.; Fewer, D. & Neilan, B. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Ver.*, **37**: 23-43.
- Dittmann, E.; Neilan, B.; Erhard, M.; von Dohren, H. & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.*, **26**(4): 779-787.
- Dow, C. & Swoboda, U. (2002). Cyanotoxins. In: Whitton, B. & Potts, M. *The Ecology of Cyanobacteria*. 1ªEd. EUA: Kluwer Academic Publishers, 613-632.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, **19**:11-15.
- Duy, T.; Lam, P.; Shaw, G. & Connell, D. (2000). Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **163**: 113-85.
- Dyble, J.; Paerl, H. & Neilan, B. (2002). Genetic Characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Isolates from Diverse Geographic Origins Based on *nifH* and *cpcBA*-IGS Nucleotide Sequence Analysis. *Appl Environ Microb*, **68**(5): 2567-2571.
- FAO (2004). *Marine Biotoxins*. FAO Food and Nutrition Paper. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 278.

- Fergusson, K. & Saint, C. (2000). Molecular Phylogeny of *Anabaena circinalis* and its Identification in Environmental Samples by PCR. *Appl Environ Microb*, **66**(9): 4145-4148.
- Fristachi, A. & Sinclair, J. (2008). Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms: workgroup report. In: Hudnell, H. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1ªEd., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 45-103.
- Funari, E. & Testai, E. (2008). Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, **38**: 97-125.
- Furey, A. *et al.* (2014). Cylindrospermopsin: Chemistry, Origin, Metabolism, Effects, and Detection. In: Botana, L. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 1ªEd. Boca Raton: CRC Press, 1031-1060.
- Garcia-Pichel, F. (2009). Cyanobacteria. In: Schaechter, M. *Encyclopedia of Microbiology*. 3ª Ed. Oxford: Elsevier, 723-740.
- Garlick, S.; Oren, A. & Padan, E. (1977). Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. *J Bacteriol*, **129**: 623-629.
- Gehring, M.; Adler, L.; Roberts, A.; Moffitt, M.; Mihali, T.; Mills, T.; Fieke, C. & Neilan, B. (2012). Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized *in planta* by symbiotic *Nostoc* sp. *The ISME Journal*, **6**: 1834-1847.
- Ghassempour, A.; Najafi, N.; Mehdinia, A.; Davarani, S.; Fallahi, M. & Nakhshab, M. (2005). Analysis of anatoxin-a using polyaniline as a sorbent in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1078**: 120-127.
- Gkelis, S.; Moustaka-Gouni, M.; Sivonen, K. & Lanaras, T. (2005). First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *J Plankton Res*, **27**: 1295-1300.
- Goldin, A.; Barchi, R.; Caldwell, J.; Hofmann, F.; Howe, J.; Hunter, J.; Kallen, R.; Mandel, G.; Meisler, M.; Netter, Y.; Noda, M.; Tamkun, M.; Waxman, S.; Wood, J. & Catterall, W. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, **28**: 365-368.
- Gonçalves, V. (2008). *Contribuição para o estudo da qualidade ecológica das lagoas dos Açores - Fitoplâncton e diatomáceas bentónicas*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Biologia, especialidade em Biologia Vegetal. Ponta Delgada. Departamento de Biologia, Universidade dos Açores.

- Gonçalves, V.; Costa, A.; Raposeiro, P.; Marques, H.; Cunha, A.; Ramos, J.; Cruz, M.; Pereira, C. & Vilaverde, J. (2012). *Monitorização das Massas de Água Interiores da Região Hidrográfica Açores. Relatório Anual de 2011 (R5/2011)*. CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 400 pp.
- Gonçalves, V.; Costa, A.; Raposeiro, P.; Marques, H.; Cunha, A.; Ramos, J.; Cruz, M.; Pereira, C. & Vilaverde, J. (2013). *Monitorização das Massas de Água Interiores da Região Hidrográfica Açores. Relatório Anual de 2012 (R5/2012)*. CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 388 pp.
- Gorham, P.R. (1964). Toxic algae. In: Jackson, D. *Algae and Man*. Nova Iorque: Plenum Press, 343.
- Gugger, M.; Lenoir, S.; Berger, C.; Ledreux, A.; Druart, J-C.; Humbert, J-F.; Guettea, C. & Bernard, C. (2005). First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*, **45**: 919-928.
- Harada, K-I.; Nagai, H.; Kimura, Y.; Suxuki, M.; Park, H-D.; Watanabe, M.; Luukkainen, R.; Sivonen, K. & Carmichael, W. (1993). Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron*, **49**(41): 9251-9260.
- Hawkins, P.; Runnegar, M.; Jackson, A. & Falconer, I. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microb*, **50**: 1292-1295.
- Henriksen, P. (1996). Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia*, **35**: 102-110.
- Hitzfeld, B.; Höger, S. & Dietrich, D. (2000). Cyanobacterial toxins, removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect*, **108**: 113-122.
- Hoagland, P.; Anderson, D.; Kaoru, Y. & White, A. (2002). The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries Coasts*, **25**: 819-837.
- Holland, A. & Kinnear, S. (2013). Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*, **11**: 2239-2258.

- Honkanen, R.; Zwiller, J.; Moore, R.; Sharon, L.; Khatrall, B.; Dukelow, M.; & Boynton (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem*, **265**(32): 19401-19404.
- Hrudey, S.; Lambert, T. & Kenefick, S. (1994). Health risk assessment of microcystins in drinking water supplies. In: *Toxic Cyanobacteria - A Global Perspective*. Adelaide, Australia: Australian Centre for Water Quality Research, 7-12.
- Hummert, C.; Reichelt, M.; Weiss, J.; Liebert, H. & Luckas, B. (2001). Identification of microcystins in cyanobacteria from the bleiloch former drinking-water reservoir (Thuringia, Germany). *Chemosphere*, **44**: 1581-1588.
- Humpage, A. (2008). Toxin Types, Toxicokinetics and Toxicodynamics. In: Hudnell, H. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1ªEd., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 384-415.
- Humpage, A.; Rositano, J.; Bretag, A.; Brown, R.; Baker, P.; Nicholson, B. & Steffensen, D. (1994). Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aus J Mar Freshwater Res* **45**: 761-771.
- Hurtado-Alarcón, J. & Polanía-Vorenberg, J. (2014). Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia. *Rev Biol Trop*, **62**(1): 403-419.
- Ito, E.; Kondo, F.; Terao, K. & Harada, K-I. (1997). Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon*, **35**: 1453-1457.
- IPQ (1997). *Qualidade da água. Doseamento de clorofila a e dos feopigmentos por espectrofotometria de absorção molecular. Método de extracção com acetona. NP 4327, 1996*. Instituto Português da Qualidade, Monte de Caparica.
- James, K.; Sherlock, I. & Stack, M. (1997). Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon*, **35**: 963-971.
- Jančula, D.; Straková, L.; Sadílek, J.; Maršálek, B. & Babica, P. (2014). Survey of cyanobacterial toxins in Czech water reservoirs - the first observation of neurotoxic saxitoxins. *Environ Sci Pollut Res*, **21**: 8006-8015.
- Jeppesen, E.; Kronvang, B.; Meerhoff, M.; Søndergaard, M.; Hansen, K.; & Andersen H.; Lauridsen, T.; Liboriussen, L.; Beklioglu, M.; Özen, A. & Olesen, J. (2009). Climate change effects on runoff, catchment phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. *J Environ Qual*, **38**: 1930-1941.



- Jochimsen, E.; Carmichael, W.; An, J.; Cardo, D.; Cookson, S.; Holmes, C.; Antunes, B.; Melo Filho, D.; Lyra, T.; Barreto, V.; Azevedo, S. & Jarvis, W. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl J Med*, **338**(13): 873-878.
- Kaas, H. & Henriksen., P. (2000). Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res*, **34**: 2089-2097.
- Kaebnick, M. & Neilan, B. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol*, **35**: 1-9.
- Kao, C. (1993). Paralytic Shellfish Poisoning. *In*: Falconer, I. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Londres: Academic Press Limited, 75-86.
- Kellmann, R.; Mihali, T.; Pickford, R.; Pomati, F.; Jeon, Y. & Neilan, B. (2008). Biosynthetic Intermediate Analysis and Functional Homology Reveal a Saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. *Appl Environ Microb*, **74**(13): 4044-4053.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2001). Cyanoprokaryota I. Teil. Chroococcales. *In*: Ettl, H.; Gartner, G.; Heynig, H. & Mollenhauer, D. *Susswasserflora von Mitteleuropa*, 19(1). G. Fischer, Jena, 548.
- Komárek, J.; Kaštovský, J.; Mareš, J. & Johansen, J. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, **86**: 295-335.
- Kosten, S.; Huszar V.; Bécares, E.; Costa L.; Van Donk, E.; Hansson, L.-A.; Jeppesen, E.; Kruk, C.; Lacerot, L.; Mazzeo, N.; Meester, L.; Moss, B.; Lürling, M.; Nöges, T.; Romo, S. & Scheffer, M. (2012). Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Glob Change Biol*, **18**: 118-126.
- Kurmayer, R. & Christiansen, G. (2009). The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Fresh water reviews*, **2**: 31-50.
- Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M.; Takahasi, H. & Kakisawa, H. (1987). Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Lett*, **28**: 4695-4698.
- Lanaras, T. & Cook, C. (1994). Toxin extraction from an *Anabaenopsis milleri* - dominated bloom. *Sci Technol Environ*, **142**: 163-169.
- Ledreux, A.; Thomazeau, S.; Catherine, A.; Duval, C.; Yéprémian C.; Marie, A. & Bernard, C. (2010). Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae*. **10**: 88-97.

- Lee, T.; Rollwagen-Bollens, G.; Bollens, M. & Faber-Hammond, J. (2015). Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in a shallow temperate lake. *Ecotox Environ Safe*, **114**: 318-325.
- Li, R.; Carmichael, W.; Brittain, S.; Eaglesham, G.; Shaw, G.; Liu, Y. & Watanabe, M. (2001). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata*. *J Phycol*, **37**: 1121-1126.
- Lorenzen, C. (1967). Determination of chlorophyll and pheo-pigments: Spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr*, **12**: 343-346.
- Lürling, M.; Eshetu, F.; Faassen, E.; Kosten, S. & Huszar, V. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol*, **58**: 552-559.
- Mahmood, N. & Carmichael, W. (1986a). Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*, **24**(2): 175-186.
- Mahmood, N. & Carmichael, W. (1986b). The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-17. *Toxicon*, **24**(5): 425-434.
- Mankiewicz-Boczek, J.; Izydorczyk, K.; Romanowska-Duda, Z.; Jurczak, T.; Stefaniak, K. & Kokocinski, M. (2006). Detection and Monitoring Toxicity of Cyanobacteria by Application of Molecular Methods. *Environ Toxicol*, **21**(4):380-387.
- Martins, J. & Vasconcelos, V. (2009). Microcystin dynamics in aquatic organisms. *J Toxicol Environ Health B*, **12**: 65-82.
- Mazmouz, R.; Chapuis-Hugon, F.; Mann, S.; Pichon, V.; Mejean, A. & Ploux, O. (2010). Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: Identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl Environ Microb*, **76**: 4943-4949.
- Mazur-Marzec, H. (2006). Characterization of phycotoxins produced by cyanobacteria. *Oceanol Hydrobiol Stud*, **35**: 85-109.
- McGregor, G.; Sendall, B.; Hunt, L. & Eaglesham, G. (2011). Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). *Harmful Algae*, **10**: 402-410.

- Méjean, A.; Mann, S.; Maldiney, T.; Vassiliadis, G.; Lequin, O. & Ploux, O. (2009). Evidence that biosynthesis of neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by 1-proline. *J Am Chem Soc*, **131**: 7512-7513.
- Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baurès, E. & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int*, **59**: 303-327.
- Meriluoto, J. & Spoof, L. (2008). Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. In: Hudnell, H. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1<sup>st</sup>Ed., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 483-500.
- Mez, K.; Hanselmann, K.; Naegeli, H. & Preisig, H. (1996). Protein-phosphatase-inhibiting activity in cyanobacteria from alpine lakes in Switzerland. *Phycologia*, **35**: 133-139.
- Mihali, T.; Kellmann, R.; Muenchhoff, J.; Barrow, K. & Neilan, B. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 716-722.
- Mihali, T.; Kellmann, R. & Neilan, B. (2009). Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochemistry*, **10**(8).
- Mikalsen, B.; Boison, G.; Skulberg, O.; Fastner, J.; Davies, W.; Gabrielsen, T.; Rudi, K. & Jakobsen, K. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol*, **185**: 2774-2785.
- Moffitt, M. & Neilan, B. (2004). Characterization of the Nodularin Synthetase Gene Cluster and Proposed Theory of the Evolution of Cyanobacterial Hepatotoxins. *Appl Environ Microb*, **70**(11): 6353-6362.
- Moreira, C.; Azevedo, J.; Antunes, A. & Vasconcelos, V. (2012). Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *J Appl Microbiol*, **114**: 605-620.
- Moreira, C.; Martins, A.; Moreira, C. & Vasconcelos, V. (2011). Toxicogenic cyanobacteria in volcanic lakes and hot springs of a North Atlantic island (S. Miguel, Azores, Portugal). *Fresen Environ Bull*, **20**(2): 420-426.
- Moreno, I.; Pereira, P.; Franca, S. & Camean, A. (2004). Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain). *Biol Res*, **37**: 405-417.

- Morin, N.; Vallaey, T.; Hendrickx, L.; Natalie, L. & Wilmotte, A. (2010). An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *J Microbiol Meth*, **80**: 148-154.
- Murray, S.; Wiese, M.; Stüken, A.; Brett, S.; Kellmann, R.; Hallegraef, G. & Neilan, B. (2011). *stxA*-Based Quantitative Molecular Assay To Identify Saxitoxin-Producing Harmful Algal Blooms in Marine Waters. *Appl Environ Microb*, **77**(19): 7050-7057.
- Namikoshi, M.; Murakami, T.; Watanabe, M.; Oda, T.; Yamada, J.; Tsujimura S.; Nagaia, H. & Oishie, S. (2003). Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, **42**(5): 533-538.
- Neilan, B.; Jacobs, D. & Goodman, A. (1995). Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. *Appl Environ Microb*, **61**(11): 3875-3883.
- Neilan, B. *et al.* (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: Hudnell, H. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1<sup>a</sup>Ed., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 416-452.
- Nicholson, B. & Burch, M. (2001). *Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines*. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment Endorsed, 64.
- Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. & Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*, **118**:420-424.
- Nishizawa, T.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K. & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem (Tokyo)*, **126**: 520-529.
- Nunes, J.; Cabral, M.; Gonçalves, V. & Cruz, J. (2011). Monitorização das massas de água interiores da região hidrográfica Açores. Relatório, INOVA, Ponta Delgada, Açores, 359.
- Oren, A. (2014). Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. In: Sharma, N.; Rai, A. & Stal, L. *Cyanobacteria an economic perspective*. 1<sup>a</sup>Ed. Reino Unido: Wiley Blackwell, 3-20.

- O'Neil, J.; Davis, T.; Burford, M. & Gobler, C. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, **14**: 313-334.
- Onodera, H.; Oshima, Y.; Henriksen, P. & Yasumoto, T. (1997). Confirmation of anatoxin-a(s) in the cyanobacterium *Anabaena lammermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon*, **35**: 1645-1648.
- Osswald, J.; Rellán, S.; Gago-Martinez, A. & Vasconcelos, V. (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int*, **33**: 1070-1089.
- Ouahid, Y.; Pérez-Silva, G. & del Campo, F. (2005). Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environ Toxicol*, **20**(3): 235-242.
- Pacheco, D.; Cymbron, R.; Verdadeiro, R.; Coutinho, R.; Rodrigues, A.; Brito, A.; Santos, R.; Rodrigues, A. & Santana, F. (2004). Monitorização da Qualidade das Águas Interiores na Região Autónoma dos Açores. *7º Congresso da Água*, Lisboa, 26-28.
- Padan, E. (1979). Facultative anoxygenic photosynthesis in cyanobacteria. *Ann Rev Plant Physiol*, **30**: 27-40.
- Paerl, H. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. *In: Hudnell, H. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1ªEd., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 217-237.
- Paerl, H. & Paul, V. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res*, **46**: 1349-1363.
- Paul, J. (2008). Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *In: Hudnell, H. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1ªEd., Vol. 619. Nova Iorque, USA: Springer, 239-257.
- Pearson, L.; Barrow, K. & Neilan, B. (2006). Characterization of the 2-Hydroxy-acid Dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J Biol Chem*, **282**(7): 4681-4692.
- Pearson, L.; Hisbergues, M.; Börner, T. & Neilan, B. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Appl Environ Microb*, **70**(11): 6370-6378.

- Pearson, L.; Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R. & Neilan, B. (2010). On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar Drugs*, **8**: 1650-1680.
- Pearson, L. & Neilan, B. (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotech*, **19**: 281-288.
- Percival, S. *et al.* (2004). *Microbiology of waterborne diseases*. 1ªEd. Elsevier Academic Press, 489.
- Pereira, C.; Raposeiro, P.; Costa, A.; Bao, R.; Giralt, S. & Gonçalves, V. (2014). Biogeography and lake morphometry drive diatom and chironomid assemblages' composition in lacustrine surface sediments of oceanic islands. *Hydrobiologia*, **730**: 93-112.
- Pereira, P.; Onodera, H.; Andrinolo, D.; Franca, S.; Araujo, F.; Lagos N. & Oshima., Y. (2000). Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, **38**:1689-1702.
- Pomati, F.; Sacchi, S.; Rossetti, C.; Giovannardi, S.; Onodera, H.; Oshima, Y. & Neilan, B. (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix sp.* FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Phycol*, **36**: 553-562.
- Porteiro, J. (2000). *Lagoas dos Açores: elementos de suporte ao planeamento integrado*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Geografia. Ponta Delgada. Departamento de Biologia, Universidade dos Açores.
- Princep, M.; Caplan, F.; Moore, R.; Patterson, G.; Honakanen, R. & Boynton, A. (1992). Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. *Phytochemistry*, **31**: 1247-1248.
- Quiblier, C.; Wood, S.; Echenique-Subiabre, I.; Heath, M.; Villeneuve, A. & Humbert J-F. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e Ecology, toxin production and risk management. *Water Research*, **47**: 5464-5479.
- Rai, A.; Pearson, A. & Kumar, A. (2013). Hepatotoxic Microcystins of Cyanobacteria, Biosynthesis and Degradation in Response to Abiotic Stress. *In*: Srivastava, A.; Rai, A. & Neilan, B. *Stress Biology of Cyanobacteria, Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. 1ª Ed. Nova Iorque: CRC Press, 341-350.

- Rantala, A.; Rajaniemi-Wacklin, P.; Lyra, C.; Lepistö, L.; Rintala, J.; Mankiewicz-Boczek, J. & Sivonen, K. (2006). Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (*mcyE*) PCR and Associations with Environmental Factors. *Appl Environ Microb*, **72**(9): 6101-6110.
- Rantala-Ylinen, A.; Känä, S.; Wang, H.; Rouhiainen, L.; Wahlsten, M.; Rizzi, E.; Berg, K.; Gugger, M. & Sivonen, K. (2011). Anatoxin-a Synthetase Gene Cluster of the Cyanobacterium *Anabaena sp.* Strain 37 and Molecular Methods to Detect Potential Producers. *Appl Environ Microb*, **77**(20): 7271-7278.
- Rapala, J.; Lahti, K.; Sivonen, K. & Niemelä, S. (1994). Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett App Microbiol*, **19**: 423-438.
- Rastogi, R.; Incharoensakdi, A. & Sinha, R. (2014a). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Rev Environ Sci Biotechnol*, **13**: 215-249.
- Rastogi, R.; Singh, S.; Incharoensakdi, A.; Häder, D. & Sinha, R. (2014b). Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia sp.* HKAR-4. *S Afr J Bot*, **90**: 163-169.
- Rinehart, K.; Harada, K.; Namikoshi, M.; Chen, C.; Harvis, C.; Munro, M.; Blunt, J.; Mulligan, P.; Beasley, V.; Dahlem, A. & Carmichael, W. (1988). Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *J Am Chem Soc*, **110**: 8557-8558.
- Rinehart, K.; Namikoshi, M. & Choi, B. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol*, **6**: 159-176.
- Rippka, R.; Waterbury, J. & Stanier, R. (1981). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some General Principles. In: Starr, M.; Stolp, H.; Trüper, A.; Balows, H. & Schlegel, H. *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. 1<sup>a</sup> Ed. Nova Iorque: Springer, 212-220.
- Runnegar, M. & Falconer, I. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructure, morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, **24**: 109-115.
- Saker, M.; Vale, M.; Kramer, D. & Vasconcelos, V. (2007). Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Appl Microbiol Biotechnol*, **75**:441-449.
- Santos, M.; Muelle, H.; Pacheco, D.; Santana, F. & Cruz, J. (2008). Toxinas de Cianobactérias na Água da Lagoa das Furnas (S. Miguel – Açores). Variação sazonal e em profundidade, 9<sup>o</sup> Congresso da Água, Estoril.

- Santos, M.; Muelle, H. & Pacheco, D. (2012). Cyanobacteria and microcystins in lake Furnas (S. Miguel island-Azores). *Limnetica*, **31**(1): 107-118.
- Santos, M.; Pacheco, D.; Santana, F & Muelle, H. (2005). Cyanobacteria Blooms in Sete-Cidades Lake (S. Miguel Island - Azores). *Algological studies*, **117**: 393-406.
- Santos, M.; Pacheco, D.; Santana, F. & Rodrigues, A. (2004). A Eutrofização das Lagoas das Sete Cidades e Furnas (S. Miguel - Açores), Análise evolutiva entre 1988 e 2002. *7º Congresso da Água*, Lisboa.
- Santos, M., Rodrigues, F. & Santana, F. (2001). *Toxicidade de cianobactérias nas lagoas das Furnas e Sete Cidades (ilha de S. Miguel/Açores)*. Relatório, DCEA/FCT/UNL, Lisboa, 59.
- Santos, M. & Santana, F. (2003). *Toxicidade de cianobactérias nas lagoas das Furnas e Sete Cidades (ilha de S. Miguel/Açores)*. 1. *O Caso da Lagoa das Furnas*, Relatório Técnico, DCEA/FCT/UNL, Lisboa, 25.
- Santos, M. & Santana, F. (2009). *Estudo da toxicidade associada aos desenvolvimentos de cianobactérias nas lagoas do Fogo, Congro, S. Brás, Canário, Empadadas, Sete Cidades e Furnas (ilha de S. Miguel/Açores)*. Relatório Técnico, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 64.
- Sarma, T. (2013). *Handbook of Cyanobacteria*. 1ª Ed. Boca Raton: CRC Press, 803.
- Sawyer, P.; Gentile, J. & Sasner, J. Jr. (1968). Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Can J Microbiol*, **14**:1199-1204.
- Schembri, M.; Neilan, B.; & Saint, C. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*, **16**: 413-421.
- Schwimmer, D. & Schwimmer, M. (1964). Algae and medicine. In: Jackson, D. *Algae and Man*. New York: Plenum Press, 343.
- Seifert, M.; McGregor, G.; Eaglesham, G.; Wickramasinghe, W. & Shaw, G. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei*. *Harmful Algae*, **6**: 73-80.
- Shevela, D.; Pishchalnikov, R.; Eichacker, L. & Govindjee (2013). Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. In: Srivastava, A.; Rai, A. & Neilan, B. *Stress Biology of Cyanobacteria, Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. 1ª Ed. Nova Iorque: CRC Press, 3-40.



- Sielaff, H.; Dittman, E.; Tandeau De Marsac, N.; Bouchier, C.; von Doehren, H.; Borner, T. & Schwecke, T (2003). The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. *Biochem J*, **373**: 909-916.
- Singh, S.; Rastogi, R.; Häder, D-P. & Sinha, R. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, **27**: 1225-1230.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, **56**: 2658-2666.
- Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, **35**: 12-24.
- Sivonen, K.; Himberg, K.; Luukkainen, R.; Niemelä, S.; Poon, G. & Codd, G. (1989). A preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxic Assess*, **4**: 339-352.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999). Cyanobacterial Toxins. In: Chorus, I. & Bartram, J. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Londres: F & FN Spon, WHO, 55-124.
- Sivonen, K.; Niemelä, S.; Niemi, R.; Lepistö, L.; Luoma, T. & Räsänen, L. (1990). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia*, **190**: 267-275.
- Skulberg, O.; Carmichael, W.; Anderson, R.; Matsunaga, S.; Moore, R. & Skulberg, R. (1992). Investigation of a neurotoxic Oscillatorialean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ Toxicol Chem*, **11**: 321-32.
- Smith, P. (2014). Cyanobacterial Toxins in Aquaculture. In: Botana, L. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 1<sup>a</sup>Ed. Boca Raton: CRC Press, 1015-1029.
- Smith, J.; Boyer, G. & Zimba, P. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites. Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, **280**: 5-20.
- Soliakov, L.; Gallagher, T. & Wonnacott, S. (1995). Anatoxin-a evoked [<sup>3</sup>H]-dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacol*, **34**(11): 1535-154.
- Spoof, L.; Berg, K.; Rapala, J.; Lahti, K.; Lepistö, L.; Metcalf, J.; Codd, G. & Meriluoto, J. (2006). First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the Boreal Environment (Finland). *Environ Toxicol*, **21**: 552-560.

- SRAM (2011). *Plano de gestão de recursos hídricos da ilha São Miguel*. Relatório Técnico - Caracterização da Situação de Referência e Diagnóstico. Vol. 2. Direção Regional do Ordenamento do Território e Recursos Hídricos, Governo Regional dos Açores, 698.
- SRAM (2013). *Monitorização da Qualidade da Água das Lagoas de São Miguel - Comparação de resultados entre 2009 e 2012*. Direção Regional do Ordenamento do Território e dos Recursos Hídricos, Governo Regional dos Açores, 196.
- Stal, L. & Moezelaar, R. (1997). Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **21**: 179-211.
- Stucken, K.; John, U.; Cembella, A.; Murillo, A.; Soto-Liebe, K.; Fuentes-Valdés, J.; Friedel, M.; Plominsky, A.; Vásquez, M. & Glöckner, G. (2010). The smallest known genomes of multicellular toxic cyanobacteria: Comparison minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *Plos One*, **5**(2): e9235.
- Tailling, J. (1974). General outline of spectrophotometric methods. In: Vollenweider, R. *A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*. 2ª Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T. & Neilan, B. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* CC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*, **7**: 753-764.
- Tillett, D.; Parker, D. & Neilan, B. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 2810-2818.
- Vaitomaa, J.; Rantala, A.; Halinen, K.; Rouhiainen, L.; Tallberg, P.; Mokolke, L. & Sivonen, K. (2003). Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 7289-7297.
- Vale, P. (2014). Saxitoxin and Analogs: Ecobiology, Origin, Chemistry, and Detection. In: Botana, L. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 1ªEd. Boca Raton: CRC Press, 991-1011.
- Van Dolah, F. (2000). Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence. *Environ Health Perspect*, **108**: 133-141.
- Vasconcelos, V. (1993). Toxicity of cyanobacteria in lakes of North and Central Portugal. Ecological implications. *Verh Internat Verein Limnol*, **25**: 694-697.

- Viaggiu, E.; Melchiorre, S.; Volpi, F.; Di Corcia, A.; Mancini, R.; Garibaldi, L.; Crichigno, G. & Bruno, M. (2004). Anatoxin a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environ Toxicol*, **19**(3): 191-197.
- Vincent, W. (2009). Cyanobacteria. In: Likens, E. *Encyclopedia of Inland Waters*. 1<sup>a</sup> Ed. Oxford: Elsevier, 226-232.
- Watanabe, M.; Oishi, S.; Watanabe, Y. & Watanabe, M. (1986). Strong possibility of lethal toxicity in the blue-green alga *Microcystis viridis*. *Lemm J Phycol*, **22**: 552-556.
- Whitton, B. (2008). Cyanobacterial diversity in relation to the environment. In: Evangelista, V.; Barsanti, L.; Frassanito, A.; Passarelli, V. & Gualteiri, P. *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. 1<sup>a</sup> Ed. Pisa, Itália: Springer, 17-43.
- Whitton, B. & Potts, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton, B. *The Ecology of Cyanobacteria II - Their Diversity in Time and Space*. 1<sup>a</sup> Ed. Springer, 1-13.
- WHO (2003). Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 136-158.
- Wiegand, C. & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol App Pharmacol*, **203**: 201-18.
- Wiese, M.; D'Agostino, M.; Mihali, T.; Moffitt, M. & Neilan, B. (2010). Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Mar Drugs*, **8**: 2185-2211.
- Williame, R.; Jurczak, T.; Iffly, J-F.; Kull, T. & Meriluto, J. (2005). Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg. *Hydrobiologia*, **551**: 99-117.
- Wilson, K.; Schembri, M.; Baker, P. & Saint, C. (2000). Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR. *Appl Environ Microb*, **66**(1): 332-338.
- Zaccaroni, A. & Scaravelli, D. (2008a). Toxicity of Fresh Water Algal Toxins to Humans and Animals. In: Evangelista, V.; Barsanti, L.; Frassanito, A.; Passarelli, V. & Gualteiri, P. *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. 1<sup>a</sup> Ed. Pisa, Itália: Springer, 45-89.
- Zaccaroni, A. & Scaravelli, D. (2008b). Toxicity of Sea Algal Toxins to Humans and Animals. In: Evangelista, V.; Barsanti, L.; Frassanito, A.; Passarelli, V. &

Gualteiri, P. *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. 1<sup>a</sup> Ed. Pisa, Itália: Springer, 91-158.

Žegura, B.; Volčič, M.; Lah, T. & Filipič, M. (2008). Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicon*, **52**(3): 518-525.

Zhang, W.; Lou, I.; Ung, W.; Kong, Y. & Mok, K. (2014). Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir. *Front Earth Sci*, **8**(2): 291-301.

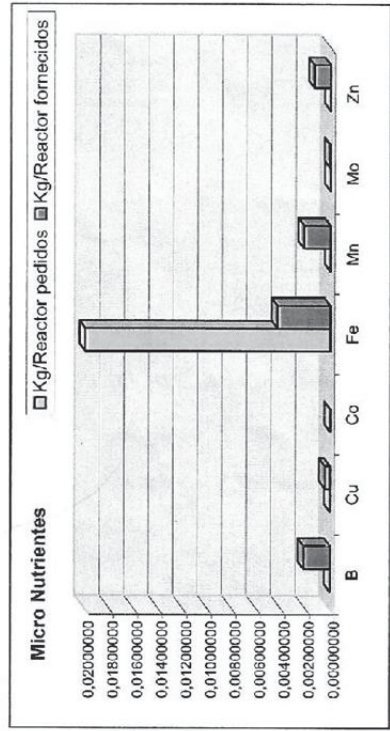
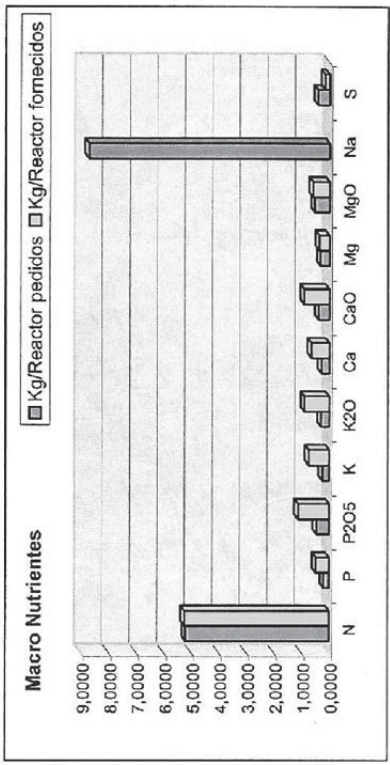
MEIO DE CULTURA TFI+M



região, análises, pesquisas e perfisados, lda.

1l TFI+M: 0,2 ml de cada stock para 1l de água destilada.

Fórmulas	Densidade g/cm <sup>3</sup>	Quantidades por Fórmula	Stock	Reagente
<b>TECNIFERTI 20.5.4.</b>				
N	20,00%			10% Azoto Amídico
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5%			5% Azoto Nítrico
K <sub>2</sub> O	4%	<b>29,241 Kg / Reactor</b>	<b>22,493 Lt / Reactor</b>	5% Azoto Amoniacal (macronutrientes)
<b>Nitrato de Cálcio com Magnésio</b>				
N	8,60%			
CaO	10,50%			
MgO	5,50%	<b>12,999 Kg / Reactor</b>	<b>8,666 Lt / Reactor</b>	4,5 % MgO 6% S
<b>TECNIFERTI Micro</b>				
MgO	4,50%			
S	6,00%			
B	0,08%			0,08% B
Cu	0,01600%			
Fe	0,16000%			0,016% Fe
Mn	0,08000%			0,08% Mn
Mo	0,00160%			0,0016% Mo
Zn	0,05000%	<b>3,250 Kg / Reactor</b>	<b>2,708 Lt / Reactor</b>	0,05% Zn



## ANEXO II

### Protocolo de extração de DNA adaptado de Doyle & Doyle (1987)

#### A. Preparação da amostra

1. Ligar o banho térmico a 60°C;
- 2a. Centrifugar a amostra, 13.500 rpm, 5 minutos e remover sobrenadante,
- 2b. Ou filtrar a amostra até saturação do papel de filtro e raspar o mesmo, colocar a amostra num *eppendorf*.

#### B. Extração do DNA

1. Colocar 499 µl de CTAB<sup>1</sup> 2x e 1 µl de mercaptoethanol em cada *eppendorf*;
2. Colocar os *eppendorfs* em banho térmico a 60°C durante duas horas, agitar ao fim de uma hora do banho;
3. Pipetar 1 ml de 24 clorofórmio:1 isoamílico, agitar durante 10 minutos;
4. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm;
5. Transferir 200/250 µl do sobrenadante para novos *eppendorfs*;

#### C. Precipitação e Eluição do DNA

1. Pipetar 200/250 µl de isopropanol;
2. Colocar durante uma hora a -80°C;
3. Centrifugar durante 30 minutos a 13200 rpm;
4. Descartar todo o sobrenadante e deixar o *pellet*;
5. Adicionar 400 µl de etanol a 70% aos *pellets*;
6. Centrifugar durante 5 minutos a 13200 rpm;
7. Descartar o sobrenadante;
8. Secar os *eppendorfs*;
9. Adicionar H<sub>2</sub>O autoclavada (≤100 µl).

#### Soluções stock:

##### <sup>1</sup>CTAB (50 ml)

NaCl 1,4 M - 14 ml  
Tris-HCl 0.1 M - 5 ml  
EDTA 0,2 mM - 2 ml  
1% PVP - 0,5 g  
2% CTAB - 1 g

## ANEXO III

### PureLink™ Plant Total DNA - Purification Kit

For purification of DNA from plant (Catalog Number K1830-01)

#### Purification Procedure

##### Before Starting

##### Binding Buffer (B4)

Add 11.5 ml 96–100% ethanol to 7.5 ml Binding Buffer (B4) included with the kit. Mix well and store the Binding Buffer (B4) with ethanol at room temperature.

##### Wash Buffer (W5)

Add 40 ml 96–100% ethanol to 10 ml Wash Buffer (W5) included with the kit. Store the Wash Buffer (W5) with ethanol at room temperature.

##### Preparing Plant Lysate

1. For hard plant tissue, freeze the tissue in liquid nitrogen and grind the tissue to a powder. For soft, non-fibrous plant tissue, cut the tissue into small pieces. For lyophilized samples, proceed to Step 2.

2. Add 250 µl Resuspension Buffer (R2) supplied in the kit to the tissue from Step 1 at room temperature.

3. Prepare lysate by homogenizing the soft tissue with a tissue homogenizer or vortexing the ground tissue/lyophilized sample until sample is completely resuspended.

4. Add 15 µl 20% SDS and 15 µl RNase A (20 mg/ml) supplied in the kit to the lysate.

5. Incubate the lysate at 55°C for 15 minutes to complete lysis.

6. Centrifuge the lysate at high speed for 5 minutes to remove insoluble materials.

7. Transfer the clear supernatant to a sterile, 1.5 ml microcentrifuge tube without disturbing the pellet.

8. Add 100 µl Precipitation Buffer (N2) supplied with the kit to the clear lysate. Mix by vortexing and incubate **on ice** for 5 minutes. The proteins and polysaccharides are precipitated and any photosynthetic pigments that are bound to proteins are also removed with this step. The pigments can stain the PureLink™ spin cartridge material that may produce colored eluate.

9. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes at room temperature to produce a clear lysate. **Note:** The supernatant should be clear and not viscous after this precipitation step.

10. Transfer 250  $\mu$ l clear lysate to a new, sterile microcentrifuge tube and add 375  $\mu$ l Binding Buffer (B4) with ethanol (previous page) to the lysate. Mix well.

#### **Binding DNA**

1. Remove a PureLink™ Spin Cartridge in a Collection Tube from the package.
2. Add sample with Binding Buffer from Step 10, previous page to the PureLink™ Spin Cartridge.
3. Centrifuge the cartridge at 10,000 g for 30 seconds at room temperature.
4. Discard the flow through and place the spin cartridge into the Wash Tube supplied with the kit

#### **Washing DNA**

1. Add 500  $\mu$ l Wash Buffer (W4) supplied in the kit to the cartridge.
2. Centrifuge the cartridge at 10,000  $\times$  g for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the column back into the tube.
3. Add 500  $\mu$ l Wash Buffer (W5) with ethanol (page 12) to the column.
4. Centrifuge the cartridge at 10,000  $\times$  g for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the cartridge back into the tube.
5. **Repeat** Steps 3-4 one more time.
6. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 2 minutes at room temperature to remove any residual Wash Buffer (W5). Discard the Wash Tube.

#### **Eluting DNA**

1. Place the spin cartridge in a sterile, DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 100  $\mu$ l of Elution Buffer (E1) or sterile, distilled water (pH >7.0).
3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 1 minute. *The elution tube contains the purified DNA.*
4. To recover more DNA, perform a second elution step using 100  $\mu$ l Elution Buffer (E1) or sterile water. You may perform the second elution using the same elution tube or in a different tube.
5. Centrifuge the column at room temperature at maximum speed for 1 minute. *The elution tube contains the purified DNA.* Remove and discard the cartridge. Based on the volume of elution buffer used for elution, the



recovery of the elution volume will vary and is usually >95% of the elution buffer volume used.

**Storing  
DNA**

- Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.

- For long-term storage, store the purified DNA in Elution Buffer (E1) at -20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

- To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.

**The Next  
Step**

The DNA isolated using the PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit is suitable for use in any downstream application of choice such as PCR, restriction enzyme digestion, or Southern Blotting.

## ANEXO IV

### DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy® Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the *DNeasy Plant Handbook*, which can be found at [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks).

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact).

#### Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II, or a mortar and pestle.

2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130  $\mu$ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.

4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 g.

6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.

7. Transfer 650  $\mu$ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  g ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.

8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500  $\mu$ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g. Discard the flowthrough.

9. Add another 500  $\mu$ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 g.

Note: remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100  $\mu$ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  g.

12. Repeat step 11.

For up-to-date licensing information and productspecific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group).  
1071299 04/2012 © 2011–1012 QIAGEN, all rights reserved.

## ANEXO V

### Protocolo de extração de DNA de cianobactérias\*

#### A. Preparação da amostra

2. Ligar o banho térmico a 55°C;
3. Remover por pipetagem 2 ml de culturas isoladas ou recolher 2-4 ml de amostra ambiental;
4. Centrifugar a amostra, 13.500 rpm, 5 minutos;
5. Remover sobrenadante.

#### B. Extração do DNA

1. Adicionar 200 µl do tampão de lise<sup>1</sup> e 20 µl de proteinase K, misturar bem por pipetagem;
2. Incubar durante 1 hora a 55°C, misturar por pipetagem a cada 10-15 minutos;
3. Adicionar 499 µl de CTAB<sup>2</sup> e 1 µl de mercaptoethanol, misturar bem por pipetagem;
4. Incubar durante uma hora a 55°C, misturar por inversão a cada 10 minutos (4-5x);
5. Dividir cada amostra em dois *pools* (devido à capacidade do *eppendorf*);
6. Adicionar 2V de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). Misturar por inversão até aparecer a emulsão branca;
7. Centrifugar durante 5 minutos, 11.100 rpm;
8. Transferir 200-500 µl do sobrenadante para um novo tubo.

#### C. Precipitação e Eluição do DNA

1. Ao sobrenadante adicionar 2V de etanol a 100% e 0,1V de acetato de sódio<sup>3</sup> (3 M, pH 5,2);
2. Incubar a -20°C, durante 1 hora;
3. Centrifugar durante 3 minutos, 11.100 rpm;
4. Descartar sobrenadante;
5. Lavagem dos *pellets* com 250 µl de etanol a 70%;
6. Centrifugar durante 3 minutos, 11.100 rpm;
7. Descartar sobrenadante e deixar evaporar o etanol residual;
8. Adicionar 25-50 µl de água ultrapura;
9. Juntar os *pools* após ressuspensão do *pellet*.
10. Guardar a -4°C.

### **Soluções Stock:**

#### **<sup>1</sup>Tampão de lise (100 ml)**

Ureia 4 M - 24,024 g  
Tris-HCl 0.2 M, pH 7,4 - 20 ml  
NaCl 20 mM - 400 µl  
EDTA 0,2 mM - 40 µl

#### **<sup>2</sup>CTAB (50 ml)**

NaCl 1,4 M - 14 ml  
Tris-HCl 0.1 M - 5 ml  
EDTA 0,2 mM - 2 ml  
1% PVP - 0,5 g  
2% CTAB - 1 g

#### **<sup>3</sup>Acetato de sódio 3 M (100 ml)**

24,60 g ou 40,80 g (3H<sub>2</sub>O)

\*Adaptado de Singh *et al.* (2011)

## ANEXO VI

As tabelas apresentadas neste anexo referem-se à totalidade dos resultados obtidos ao longo do estudo, particularmente das amostragens mensais.

**Tabela 23.** Totalidade dos resultados de análise molecular e físico-química das lagoas amostradas. -: sem amplificação; +: gene amplificado; x: amostra não testada; a: parâmetro não registrado.

	Quantificação		PC-IGS PC $\beta$ -F/ PC $\alpha$ -R	mcyB 2156F/ 3111R	mcyC PSCF1/ PSCR1	mcyD PKDF1/ PKDR1	mcyD PKDF2/ PKDR2	mcyE PKEF1/ PKER1	mcyG PKGF1/ PKGR1	stxA	anaC- gen	Chla ( $\mu$ g/l)	Temp ( $^{\circ}$ C)	pH	Cond ( $\mu$ S/cm)
	DNA (ng/ $\mu$ l)	260/280													
março	R(Mi)	4,9	-	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	CN(Mi)	3,2	-	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	EN(Mi)	5,7	-	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	ES(Mi)	14,7	-	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	RS(Mi)	18,9	-	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	ST(Mi)	19,2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	a	a	a	a
	V(Mi)	34,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a	a	a
	A(Mi)	9,5	+	-	-	-	-	-	+	-	+	a	a	a	a
	R(Mi)	15,3	2,21	+	-	-	-	-	-	-	-	1,65	13,1	5,74	38,95
abril	CN(Mi)	17,4	-	x	x	x	x	x	x	x	x	6,27	13,3	5,76	39,07
	EN(Mi)	113,8	-	x	x	x	x	x	x	x	x	11,73	12,7	6,51	36,44
	ES(Mi)	86,6	-	x	x	x	x	x	x	x	x	3,84	13,3	6,83	44,78
	RS(Mi)	54,4	-	x	x	x	x	x	x	x	x	1,65	15,9	4,99	42,3
	ST(Mi)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	a	a	a	a
	V(Mi)	58,7	1,82	+	-	-	-	-	-	-	-	33,68	16,5	9,68	126,3
	A(Mi)	25,2	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-	4,03	16,9	9,34	100,3
	FN(Mi)	68,3	1,74	-	-	-	-	-	-	-	-	64,28	18,5	9,65	158,3
	SB(Mi)	33,7	1,82	+	-	-	-	-	-	-	-	6,44	14,9	5,67	40,78
CG(Mi)	60,7	1,84	+	-	-	-	-	+	-	-	14,00	15,8	9,08	97,96	
AR(Mi)	81,7	1,7	-	x	x	x	x	x	x	x	1,65	15,1	5,49	39,48	
PDR(Mi)	134,9	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-	342,23	15,9	9,72	74,05	
FG(Mi)	72,7	1,9	-	x	x	x	x	x	x	x	2,98	13,5	6,88	45,15	

Tabela 23. Cont.

	Quantificação		PC-IGS PC $\beta$ -F/ PC $\alpha$ -R	mcy B 2156F/ 3111R	mcy C PSCF1/ PSCR1	mcy D PKDF1/ PKDR1	mcy D PKDF2/ PDKR2	mcy E PKEF1/ PKER1	mcy G PKGFI/ PKGRI	stxA	anaC- gen	Chl-a ( $\mu$ g/l)	Temp ( $^{\circ}$ C)	pH	Cond ( $\mu$ S/cm)
	DNA (ng/ $\mu$ l)	260/280													
R(Mi)	35,8	1,96	-	x	x	x	x	x	x	x	x	2,93	12,69	5,95	33,76
CN(Mi)	74,5	1,86	-	x	x	x	x	x	x	x	x	7,36	15,03	5,09	40,63
EN(Mi)	20,9	1,78	-	x	x	x	x	x	x	x	x	8,32	15,14	5,69	37,20
ES(Mi)	149,2	2,17	-	x	x	x	x	x	x	x	x	2,59	13,59	5,67	47,49
RS(Mi)	17,8	1,84	-	x	x	x	x	x	x	x	x	0,67	16,85	4,42	47,49
ST(Mi)	39,5	1,93	+	-	-	+	-	-	+	+	-	3,38	16,44	8,12	124,68
V(Mi)	64,3	1,9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	19,43	17,28	8,14	125,40
A(Mi)	135,4	1,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,10	18,53	7,52	101,20
FN(Mi)	73,7	1,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,07	18,49	8,6	148,69
SB(Mi)	28,3	1,58	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4,53	15,81	6,5	42,34
CG(Mi)	52,3	2,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,17	17,69	9,85	114,38
AR(Mi)	11,8	1,65	-	x	x	x	x	x	x	x	x	1,77	17,59	6,47	38,91
PDR(Mi)	197,2	2,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,52	15,31	8,81	61,21
FG(Mi)	8,2	1,54	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2,30	16,23	7,03	45,77
R(Mi)	14,7	1,42	-	x	x	x	x	x	x	x	x	1,62	16,2	6,64	33,76
CN(Mi)	17,5	1,56	-	x	x	x	x	x	x	x	x	3,30	17,6	6,52	37,2
EN(Mi)	14,2	1,54	-	x	x	x	x	x	x	x	x	3,59	17,04	6,45	37,2
ES(Mi)	45,5	1,89	-	x	x	x	x	x	x	x	x	3,58	17,23	6,54	44,06
RS(Mi)	9,6	1,68	-	x	x	x	x	x	x	x	x	0,34	18,35	5,58	45,772
ST(Mi)	11,7	1,7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	5,77	19,86	8,56	119,53
V(Mi)	9,9	1,6	+	-	+	+	-	+	+	-	-	13,73	21,11	8,04	119,53
A(Mi)	10,3	1,76	+	-	-	+	-	+	+	+	-	1,34	20,67	7,39	98,95
FN(Mi)	13,7	2,08	+	-	+	+	-	+	+	-	-	49,74	25,31	7,39	140,11
SB(Mi)	66	1,89	-	x	x	x	x	x	x	x	x	11,53	22,45	7,04	38,91
CG(Mi)	140,9	1,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,92	20,97	8,68	98,94

Tabela 23. Cont.

	Quantificação		PC-IGS PC $\beta$ -F/ PC $\alpha$ -R	<i>mcy</i> B		<i>mcy</i> C		<i>mcy</i> D		<i>mcy</i> E		<i>mcy</i> G		<i>anaC-</i> <i>gen</i>	Chl- <i>a</i> ( $\mu$ g/l)	Temp ( $^{\circ}$ C)	pH	Cond ( $\mu$ S/cm)
	DNA (ng/ $\mu$ l)	260/280		2156F/ 3111R	PSCF1/ PSCR1	PKDF1/ PKDR1	PKDF2/ PDKR2	PKEF1/ PKER1	PKGFI/ PKGRI	2156F/ 3111R	PSCF1/ PSCR1	PKDF1/ PKDR1	PKDF2/ PDKR2					
junho	AR(Mi)	1,78	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4,12	22,03	5,91	39,91
	PDR(Mi)	1,77	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,14	24,43	8,49	64,64
	FG(Mi)	16	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2,94	19,52	6,26	49,2
	R(Mi)	11,9	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5,77	22,08	7,53	35,48
julho	CN(Mi)	27,1	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	a	23,44	7,42	37,20
	EN(Mi)	25,7	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16,85	21	7,37	37,20
	ES(Mi)	5,1	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4,12	23,02	8,42	47,49
	RS(Mi)	23,1	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,98	24,86	5,76	45,77
	ST(Mi)	28,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,86	25	9,39	126,39
	V(Mi)	10,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,63	25,96	9,42	128,11
	A(Mi)	12,8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,37	26,05	8,12	102,38
	FN(Mi)	83,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,12	26,01	7,69	141,83
	SB(Mi)	30,5	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	7,21	22,86	7,07	40,63
	CG(Mi)	17,4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,12	23,01	8,32	97,23
	AR(Mi)	30,9	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2,57	23,54	6,88	38,91
	PDR(Mi)	37,2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74,96	21,71	9,29	83,51
FG(Mi)	46,8	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,82	20,54	6,88	50,92	



Tabela 24. Dados ambientais registrados *in situ* no momento da amostragem.

Mês	Amostra	T(°C)	Vento	Precipitação	Sol	Nebulosidade	Mês	Amostra	T(°C)	Vento	Precipitação	Sol	Nebulosidade
abril	R(Mi)	27/04/2015 17-18°C	4	1	2	6	junho	R(Mi)	29/06/2015 24-19°C	3	1	2	5
	CN(Mi)		3	2	2	6		CN(Mi)		3	1	2	5
	EN(Mi)		4	1	2	6		EN(Mi)		3	1	2	5
	ES(Mi)	2	1	2	6	RS(Mi)		3	1	2	5		
	RS(Mi)	4	2	2	6	ST(Mi)		2	2	2	5		
	ST(Mi)	1	2	2	6	V(Mi)		3	2	2	5		
	V(Mi)	2	2	2	6	A(Mi)		1	2	2	5		
	A(Mi)	2	2	2	3	FN(Mi)		2	2	1	1		
	FN(Mi)	4	2	2	5	SB(Mi)		1	2	1	1		
	SB(Mi)	1	2	2	3	CG(Mi)		0	2	1	2		
CG(Mi)	1	2	1	2	AR(Mi)	0	2	1	1				
AR(Mi)	2	2	1	3	PDR(Mi)	0	2	1	1				
PDR(Mi)	1	2	1	2	FG(Mi)	0	2	1	2				
FG(Mi)	4	1	2	4	R(Mi)	2	2	1	3				
R(Mi)	0	1	2	4	CN(Mi)	1	2	1	3				
CN(Mi)	3	1	2	4	EN(Mi)	2	2	1	2				
EN(Mi)	2	1	2	4	ES(Mi)	2	2	1	3				
ES(Mi)	2	1	2	3	RS(Mi)	1	2	1	3				
RS(Mi)	2	2	1	2	ST(Mi)	1	2	1	3				
ST(Mi)	2	2	2	4	V(Mi)	1	2	1	2				
V(Mi)	4	2	2	4	A(Mi)	1	2	1	2				
A(Mi)	0	1	2	3	FN(Mi)	1	2	1	2				
FN(Mi)	0	2	2	3	SB(Mi)	1	2	1	2				
SB(Mi)	0	2	2	2	CG(Mi)	1	2	1	2				
CG(Mi)	0	2	2	3	AR(Mi)	1	2	1	2				
AR(Mi)	0	2	2	3	PDR(Mi)	0	2	1	2				
PDR(Mi)	0	1	2	3	FG(Mi)	0	2	1	2				
FG(Mi)	0	1	1	4		1	2	1	3				

Vento
1-fraco
2-moderado
3-forte
4-muito forte

Precipitação/sol
1-sim
2-não

Nebulosidade
1-sem nuvens
2-parcialmente encoberto
3-encoberto
4-nublado
5-muito nublado
6-fechado