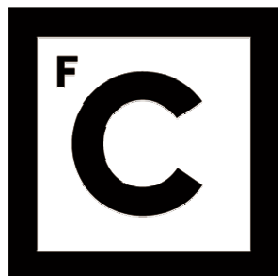


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências**  
**ULisboa**

**Explorando a razão de bactérias do meio  
aquático não serem afetadas por microcistinas:  
sistema antioxidante vs. degradação**

André Filipe Jacinto Pinto

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Doutora Elisabete Valério  
Prof.<sup>a</sup> Maria Teresa Rebelo

2016

## Nota Prévia

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da revista *Toxins*.

A escrita deste documento seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

Este trabalho deu origem à seguinte comunicação em forma de poster:

**UNVEILING THE REASON WHY FRESHWATER HETEROTHOPHIC BACTERIA ARE NO AFFECTED BY MICROCYSTINS: ANTIOXIDANT SYSTEM VS. DEGRADATION**, apresentada no ICOETOX 2016 no Porto, Portugal, 21-23 de Junho de 2016.

## **Agradecimentos**

Deixo aqui os agradecimentos para todos os que me apoiaram durante esta tese, em particular aos seguintes:

A minha orientadora, a doutora Elisabete Valério, agradeço pela paciência infinita para me ajudar e pelos conhecimentos transmitidos ao longo de um excelente estágio.

A professora Maria Teresa Rebelo, por me ter aceitado ter-me orientado, e pela sua disponibilidade e ajuda com esta tese.

Aos meus colegas no laboratório de biologia e ecotoxicologia do INSA, Sérgio Paulino, Elsa Dias, Carina Menezes e Sara Barreiros, agradeço a amizade e ajuda que me deram ao longo de todo o estágio.

Aos meus amigos e família pelo apoio e ajudas constante que me deram ao longo deste estágio e de toda a vida.

## Resumo

As microcistinas são a classe de hepatotoxinas mais vulgarmente produzidas por cianobactérias. Estas são encontradas em ecossistemas aquáticos onde convivem com outros microorganismos, tais como *Aeromonashydrophila* e *Flavobacterium* sp. Já existe uma quantidade razoável de estudos sobre o efeito de microcistinas em organismos eucarióticos, mas existem poucos estudos sobre os efeitos destas toxinas em microorganismos. Os escassos estudos existentes mostram que as microcistinas podem causar uma diminuição do crescimento microbiano, não o inibindo completamente. Neste estudo, o objectivo é determinar a razão pela qual bactérias heterotróficas aquáticas não são muito afectadas pela presença de microcistinas no seu meio de crescimento. Para tal, a actividade de algumas enzimas do sistema antioxidante foram avaliadas e a presença de genes responsáveis pela degradação das microcistinas (*mcrA-D*) foi avaliada em isolados recuperados a partir de água doce onde as microcistinas são comumente encontradas. Estes resultados foram comparados com as bases pré-existentes na literatura para avaliar a importância da presença ou ausência dos genes responsáveis pela degradação microcistinas com a resistência natural encontradas nas bactérias heterotróficas aquáticas. Além disso, a actividade das enzimas do sistema antioxidante também foi contabilizada para explicar este comportamento. Os comportamentos observados parecem indicar que estão mais relacionados com especificidades da estirpe, não havendo um comportamento similar entre os isolados da mesma espécie. Devido ao facto deste tema de trabalho se inserir numa área ainda pouco explorada, existem atualmente mais questões do que respostas. Contudo, não se pode deixar de destacar a relevância do tema, devido à necessidade de perceber o impacto da presença das cianotoxinas nos ecossistemas do meio aquático.

**Palavras-chave:** Microcistinas, Bactérias Heterotróficas, Sistema Antioxidante

## Abstract

Microcystins are the class of hepatotoxins most commonly produced by cyanobacteria. These are found in aquatic ecosystems where they coexist with other microorganisms such as *Aeromonashydrophila* and *Flavobacterium sp.* There are already a fair amount of studies on the effect of microcystins in eukaryotic organisms, but there are only a few studies about the effects of these toxins in microorganisms. The scarce existing studies show that microcystins can cause a decrease of the microbial growth, even though not being fully inhibited by it. In this study the aim is to determine the reason why aquatic heterobacteria are not very affected by the presence of microcystins in their growth medium. Therefore, the activity of some enzymes of the antioxidant system was evaluated and the presence of genes responsible for microcystin degradation (*mcrA-D*) was assessed in isolates recovered from freshwaters where microcystins are commonly found. These results were compared with the pre-existing bases on the literature to evaluate the relevance of the presence or absence of the genes responsible for microcystin degradation with the natural resistance found in heterobacteria from aquatic environments. Moreover, the activity of the enzymes from the antioxidant system also was accounted to explain this behavior. The observed behaviors seem to indicate that they are more related to specificities of the strain, than to a common behavior among the isolates of the same species. Due to the fact that this theme of work is inserted in an area that has been scarcely explored, currently there are even more questions than answers. However, the relevance of the topic cannot be underemphasized due to the need to understand the impact of the presence of cyanotoxins on the ecosystems of the aquatic environments.

**Keywords:** Microcystins, Heterotrophic Bacteria, Antioxidant System

# Índice

Nota Prévia.....	2
Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Índice.....	6
Índice de Tabelas.....	7
Índice de Figuras.....	7
Índice de Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
1.1 Cianobactérias.....	10
1.2 <i>Blooms</i> de cianobactérias e cianotoxinas.....	11
1.3. Bactérias heterotróficas e biodegradação de microcistinas.....	13
1.4. Sistema antioxidante bacteriano e <i>stress oxidativo</i> .....	14
1.5. Enquadramento no mestrado.....	15
2. Objectivos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Recolha dos isolados.....	17
3.2 Caracterização dos isolados bacterianos.....	17
3.3. Identificação molecular dos isolados bacterianos.....	18
3.4. Crescimento bacteriano.....	19
3.5. Amplificação de genes de degradação da microcistina ( <i>mlr</i> ).....	20
3.6. Determinação das actividades enzimáticas do sistema antioxidante.....	21
4. Resultados.....	22
4.1. Caracterização dos isolados.....	22
4.2. Curvas de crescimento.....	25
4.3. Genes <i>mlr</i> .....	32
4.4. Actividades enzimáticas.....	32
5. Discussão.....	34
6. Conclusão e Considerações Finais.....	36
7. Bibliografia.....	37
8. Sitiografia.....	39

# Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Lista dos isolados utilizados neste trabalho. ....	18
Tabela 3.2: Lista de primers usado para amplificar os genes de degradação da microcistinas ( <i>mlr</i> ).....	20
Tabela 4.1: Dados macroscópicos dos isolados utilizados neste trabalho.....	23
Tabela 4.2: Dados microscópicos dos isolados utilizados neste trabalho. ....	24
Tabela 4.3: Presença de genes <i>mlr</i> nos isolados.....	32
Tabela 4.4: Atividades relativas da catalase.....	32
Tabela 4.5: Atividades relativas da SODtotal .....	33

# Índice de Figuras

Fig. 1.1: Ilustração da diversidade de formas presentes no grupo das cianobactérias, adaptado de Arizona, 2016.....	10
Fig. 1.2: Foto de satélite de um <i>bloom</i> de cianobactérias no lago Atitlán, Guatemala no dia 22 de Novembro de 2009 (NASA, 2016). ....	11
Fig. 1.3: Estrutura da geral das microcistinas, com as posições radicais em $X^{(2)}$ e $Z^{(4)}$ (Tillet <i>et al.</i> , 2000). ....	12
Fig. 1.4: Ciclo de degradação da microcistinas mediada pelas enzimas codificadas pelos genes <i>mlr</i> . ....	13
Fig. 1.5: Reação catalisada pela enzima SOD.....	14
Fig. 3.1: mapa da região onde os isolados foram recolhidos. ....	17
Fig. 3.2: Representação da inoculação das placas, com réplicas em quintuplicado. Cinzento – branco (meio NB), verde - controlo negativo (meio NB + células), castanho - ensaios com MCLR, vermelho – ensaios com MCRR, roxo – ensaios com MCYR, azul - vazios.....	19
Fig. 4.1: Gráficos das curvas de crescimento do isolado A2 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	26
Fig. 4.2: Gráficos das curvas de crescimento do isolado A3 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	27
Fig. 4.3: Gráficos das curvas de crescimento do isolado O3 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	28
Fig. 4.4: Gráficos das curvas de crescimento do isolado R1 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	29
Fig. 4.5: Gráficos das curvas de crescimento do isolado R2 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	30
Fig. 4.6: Gráficos das curvas de crescimento do isolado R4 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado. ....	31

# Índice de Abreviaturas

ADN – Acido desoxirribonucleico

CAT – Catalase

DSA ASBE – Departamento de Saúde Ambiental - Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

MC – Microcistina

MCs – Microcistinas

MCLR – Microcistina LR

MCRR – Microcistina RR

MCYR – Microcistina YR

NB – *Nutrient Browth*

NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information

PCR – Reação em cadeia de polimerase

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

rRNA – Acido ribonucleico ribossomal

SOD – Superóxido dismutase

UTI-INSA – Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Ricardo Jorge (Serviço de sequenciação)

UV – radiação ultravioleta



# 1. Introdução



## 1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são um grupo diverso de organismos procariotas, que ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos em virtude da sua idade, havendo registo fósseis destes organismos com 3,5 mil milhões de anos, na altura da era Pré-Câmbrica.

São organismos fotoautotróficos, fixadores de azoto, mas muitos podem crescer heterotroficamente usando a luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono (Steward *et al.*, 2006). As cianobactérias encontram-se extremamente difundidas pelo planeta, colonizando água doce, ecossistemas marinhos e terrestres, incluindo até habitats extremos, como lagos árticos, salinas e nascentes de água quente. Estas podem existir isoladamente ou em simbiose com outras espécies tais como plantas ou fungos, como por exemplo líquenes do género *Peltigera* (Hodkinson *et al.*, 2014).

As cianobactérias possuem diversas formas existindo unicelularmente, em formas filamentosas ou até formando colônias (Fig. 1.1). Algumas das formas filamentosas diferenciam as células para diversas funções tais como: as células fotossintéticas simples; acinetos que são células com paredes celulares mais densas e com largas reservas de alimentos que servem como células de sobrevivência; heterocitos que são células especializadas em fixação de azoto.



Fig. 1.1: Ilustração da diversidade de formas presentes no grupo das cianobactérias, adaptado de Arizona, 2016.

As cianobactérias possuem um impacto enorme no nosso planeta, contribuindo significativamente para a ecologia global e para o ciclo do oxigénio. Por exemplo, o género *Prochlorococcus* foi descoberto em 1986 e é responsável por mais de metade da fotossíntese ocorrente nos oceanos (Nadis, 2003).

Sendo uma parte importante do fitoplâncton, mas não são os únicos organismos presentes. Existem outros organismos tanto procariotas como eucariotas nesse mesmo fitoplâncton, sendo estes uma base essencial da rede trófica.

## 1.2 *Blooms* de cianobactérias e cianotoxinas

Com a presença de uma quantidade de nutrientes e luz favoráveis as cianobactérias podem crescer rapidamente criando populações de alta densidade (Fig. 1.2) chamadas de *blooms* (Bláha *et al.*, 2009). A primeira ocorrência registada cientificamente de um *bloom* ocorreu em 1878 no sul da Austrália (Francis, 1878). Cerca de 40% dos lagos na Europa, Ásia e América oferecem condições adequadas para o aparecimento destes *blooms* (Bláhová *et al.*, 2008).



**Fig. 1.2:** Foto de satélite de um *bloom* de cianobactérias no lago Atitlán, Guatemala no dia 22 de Novembro de 2009 (NASA, 2016).

Um dos fatores mais significativos que promove o aparecimento de *blooms* é o excesso de nutrientes que se verifica nos lagos destes continentes devido ao uso de fertilizantes na agricultura ou fins recreativos nas terras adjacentes à bacia hidrográfica, o que leva a uma eutrofização das massas de água. Para além disso, as consequências das mudanças globais de clima têm sido discutidas em conexão com a ecologia e crescimento de cianobactérias (Beardall & Raven, 2004). Os *blooms* de cianobactérias causam diversos efeitos adversos tais como mau cheiro, perda da potabilidade, consumo excessivo de oxigénio na água e a mortalidade dos peixes e outras espécies aquáticas presentes, como consequência do consumo de oxigénio, bloqueio da luz nas camadas inferiores da água, e a libertação de amónia e de

cianotoxinas (Chorus *et al.*, 2000). Estima-se que 25% a 75% dos *blooms* de cianobactérias sejam tóxicos (Bláhová *et al.*, 2008).

As cianotoxinas são um grupo diverso de compostos, tanto de um ponto de vista químico como toxicológico. Em termos de alvos toxicológicos existem cianotoxinas hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas, entre outras (Wiegand & Pflugmacher, 2005). De um ponto de vista químico as cianotoxinas dividem-se em 3 grupos principais: péptidos, compostos heterocíclicos (alcalóides) e compostos lipídicos (Sivonen & Jones, 1999).

Muitas espécies de cianobactérias produzem um grupo de hepatotoxinas conhecidas por microcistinas. Dos géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Snowella*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Woronichinia* e *Nostoc* já foram isoladas microcistinas (WHO, 2003; Codd *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2010), sendo a espécie mais frequentemente associada à produção da mesma *Microcystis aeruginosa* (WHO, 1999). As microcistinas pertencem à família dos heptapeptídeos monocíclicos possuindo já mais de 80 variantes identificadas, e apresentando a estrutura comum indicada na fig. 1.3 (Pearson *et al.*, 2010).

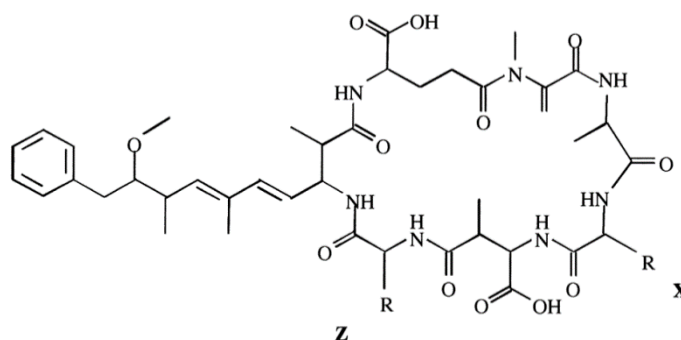


Fig. 1.3: Estrutura da geral das microcistinas, com as posições variáveis em X e Z, adaptado de Tillet *et al.*, 2000.

As isoformas mais comuns e estudadas são a microcistina-LR, microcistina-RR, e microcistina-YR (Li *et al.*, 2009). As microcistinas são das cianotoxinas mais prevalentes no ambiente e apresentam-se em altas quantidades na biomassa das cianobactérias, chegando a atingir 1% da massa seca (Harada *et al.*, 1996). Ainda que sejam um tópico de bastante investigação, a função fisiológica ou ecológica natural das microcistinas não é bem conhecida (Welker & von Dohren, 2006). As microcistinas são extremamente estáveis e resistem aos processos mais comuns de degradação química como a hidrólise e a oxidação nas condições das águas onde são encontradas. Estas podem ser degradadas lentamente a altas temperaturas (40°C), com pH muito baixo (<1) ou pH alto (>9), mas possuem uma tolerância a temperaturas elevadas levando a que a fervura da água não seja suficiente para as destruir (Harada *et al.*, 1996). A produção de microcistinas por parte das cianobactérias constitui um potencial perigo para a saúde humana e animal, que dependendo da dose e tempo de exposição pode provocar doenças várias no fígado ou até morte (Codd *et al.*, 2005). De um modo geral o impacto das cianotoxinas no seu meio aquático é afetado pelos seguintes processos: diluição, adsorção, bioacumulação e degradação, sendo esta degradação subdividida em processos físico-químicos de degradação (fotólise) e biodegradação. Destes processos a fotólise e a biodegradação são os que possuem maior capacidade de inativar completamente as cianotoxinas (Chenet *et al.*, 2010).

### 1.3. Bactérias heterotróficas e biodegradação de microcistinas

As bactérias heterotróficas são procariotas que estão envolvidos em diversos ciclos geoquímicos nos seus habitats aquáticos e devido esse papel são uma das bases da rede trófica (Figueiredo *et al.*, 2007). Vários estudos apontam para a presença de bactérias heterotróficas degradadoras de microcistinas em todo o mundo e sugerem que estas sejam um fator importante na remoção natural de microcistinas (Bourneet *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2012). Alguns estudos mostram também que a presença de bactérias heterotróficas pode influenciar positivamente o crescimento de algumas espécies de cianobactérias, apesar de algumas destas possuírem a capacidade de degradar as hepatotoxinas das cianobactérias (Berg *et al.*, 2009).

A exposição de microcistinas a comunidades bacterianas influencia a forma e a fisiologia das bactérias, dado que as bactérias sem resistências as microcistinas não conseguem crescer deixando de competir com as bactérias resistentes. Este facto poderia explicar o papel de cianobactérias tóxicas como controladores da diversidade do fitoplâncton, causando desequilíbrios ecológicos e a contaminação do ambiente (Campos *et al.*, 2013).

Ainda que as microcistinas possam ser degradadas por proteases bacterianas, estas nem sempre estão presentes no mesmo reservatório de água, podendo assim as microcistinas persistir nesses reservatórios de água por meses ou anos (Jones *et al.*, 1994). Um exemplo de um grupo de microrganismos que possui a capacidade de degradar as microcistinas é o género *Sphingomonassp.*, que realiza a degradação das microcistinas através de uma via enzimática mediada pelo menos por três enzimas hidrolíticas intracelulares (Fig. 1.4). O passo mais importante é a hidrólise, que causa a abertura do anel da microcistina linearizando-a e é mediado por uma enzima denominada microcistinaw, codificada pelo gene *mlrA*. A segunda enzima (codificada pelo gene *mlrB*) corta a microcistina e a última (codificada pelo gene *mlrC*) degrada os produtos formados pelas enzimas anteriores num produto não tóxico (Bourneet *et al.*, 2001).

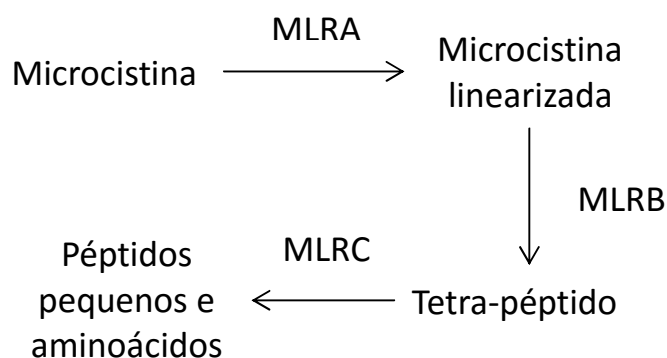


Fig. 1.4: Ciclo de degradação da microcistinas mediada pelas enzimas codificadas pelos genes *mlr*.

As bactérias escolhidas para este trabalho são da espécie *Aeromonas hydrophyla* (Chester, 1901) Stanier, 1943 e do género *Flavobacterium*, devido às informações provenientes de Miguéns & Valério, (2015) sobre a resistência das mesmas a microcistinas.

As bactérias da espécie *Aeromonas hydrophyla* são bastonetes heterotróficos Gram negativos com capacidade de se moverem. Podem ser geralmente encontradas em climas quentes, em águas doces, salobras e marinhas, sendo também capaz de existir em águas com cloro (Van der Kooj, 1988). São catalase e superóxido dismutase positivas (Abbot *et al.*, 2003).

As bactérias do género *Flavobacterium* são bastonetes Gramnegativos, possuindo espécies móveis e não móveis. São encontradas em praticamente todos os tipos de ambientes desde água doce a salgada, no solo e ambiente árticos. São catalase e superóxido dismutase positivas (Holt *et al.*, 1994).

#### 1.4. Sistema antioxidante bacteriano e stress oxidativo

Para além dos efeitos enunciados anteriormente das microcistinas, existem diversos estudos que demonstram como um dos efeitos da exposição a microcistinas é a indução de stress oxidativo (Li *et al.*, 2008). A presença de microcistinas induz a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como os radicais superóxidos, peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo (Pflugmacher, 2004). Os ROS podem criar sérios danos celulares, tais como a peroxidação das membranas lipídicas, genotoxicidade ou modulação da apoptose e até necrose (Ding & Ong, 2003). Contudo as células possuem mecanismos enzimáticos defensivos que utilizam para se protegerem do impacto dos ROS. O stress oxidativo é o resultado da combinação de um ou mais dos seguintes efeitos: um aumento da produção de ROS, uma diminuição de eficácia na protecção antioxidante ou uma falha nos mecanismos de reparação dos danos oxidativos. As enzimas mais importantes do sistema antioxidante são a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), cuja presença existe em praticamente todos os organismos (Pflugmacher, 2004).

A superóxido dismutase é uma enzima que tem como função converter os radicais de ião superóxido em  $H_2O_2$ ,  $O_2$  e  $H_2O$  (Fig. 1.5). Estas enzimas são metaloproteínas contendo Mn, Fe ou Cu e Zn na sua estrutura, e os três tipos de SOD existentes encontram-se em localizações celulares diferentes: SOD1 encontra-se no citosol e possui Cu / Zn, a SOD2 é mitocondrial e possui Mn / Fe, e a SOD3 é extracelular e possui Cu / Zn (Radha, 2010).

#### Superóxido dismutase

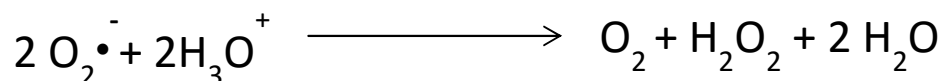


Fig. 1.5: Reação catalisada pela enzima SOD.

A principal função da catalase é decompor o  $H_2O_2$  e proteger a célula bacteriana de outros ROS. Quando o  $H_2O_2$  está presente numa concentração alta a CAT actua cataliticamente e remove-o através da formação de  $H_2O$  e  $O_2$  (Radha, 2010). No entanto, a uma baixa

concentração de  $H_2O_2$  e na presença de um doador de hidrogénio adequado, como por exemplo o etanol, a CAT actua removendo o  $H_2O_2$ , mas oxidando o seu substrato (Kim *et al.*, 1994).

## 1.5. Enquadramento no mestrado

Este trabalho enquadra-se no mestrado de biologia humana e ambiente dado que os *blooms* de cianobactérias são uma ocorrência cada vez mais comum devido ao impacto humano nos ambientes aquáticos. Uma vez que estes fenómenos representam um perigo para os seres humanos e o ambiente, torna-se necessário haver uma melhor compreensão dos mecanismos bacterianos envolvidos na degradação de microcistinas.

## 2. Objectivos

Este estudo pretende dar respostas a questões que surgiram durante o trabalho que resultou na publicação de Miguéns & Valério, 2015, nomeadamente se a espécie *Aeromonashydrophyla* e o género *Flavobacterium* seriam especialmente resistentes às microcistinas e qual a razão dessa possível resistência. Para avaliar a resistência das bactérias pretende-se determinar as curvas de crescimento destas bactérias na presença de diferentes concentrações das três variantes mais comuns de microcistinas. Serão também avaliados alguns mecanismos possíveis de resistência, tais como a ativação de enzimas do sistema antioxidante e a presença de genes do complexo de degradação das microcistinas *-mlr*.



### 3. Materiais e Métodos







**Tabela 3.1: Lista dos isolados utilizados neste trabalho.**

<b>Isolado</b>	<b>Origem</b>	<b>Notas</b>
A2	Albufeira do Alvito, 21/04/2015	Colónias amarelas
A3	Albufeira do Alvito, 21/04/2015	Colónias brancas
O2	Barragem do Odivelas, 21/04/2015	Colónias amarelas
O3	Barragem do Odivelas, 21/04/2015	Colónias brancas
R1	Albufeira do Roxo, 21/04/2015	Colónias amarelas
R2	Albufeira do Roxo, 21/04/2015	Colónias amarelas
R4	Albufeira do Roxo, 21/04/2015	Colónias brancas
B6	Albufeira do Monte da Barca, 29/10/2012	Usado como controlo (Miguéns & Valério, 2015)

### **3.3. Identificação molecular dos isolados bacterianos**

Para confirmar a identificação dos isolados, recorreu-se à sequenciação do gene 16S rRNA, uma vez que é um gene bacteriano universal e que se pode facilmente comparar com as bases de dados existentes, por exemplo na NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitindo assim chegar a uma identificação.

O ADN bacteriano foi extraído com recurso ao kitInvisorb® Spin Plant Mini Kit (INVITEK), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do ADN resultante foram quantificadas com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

O PCR realizado para amplificação do gene 16S rRNA, o gene de referência em bactérias para identificação, utilizou uma mix de 25 µL contendo: 2 µL de ADN (200-300 ng), tampão de PCR 1x (Invitrogen), 0,025 mM de dNTPs, 5 µM de cada primer, 1 mg/mL BSA, 4 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen). Foram utilizados os primers 8F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner *et al*, 1999) que produzem um fragmento de amplificação esperado de 800 pb. As reacções foram efetuadas num termocicladorTpersonal (Biometra®) com a tampa aquecida a 95°C, com os seguintes cinco passos: 10 min de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 s de desnaturação a 94°C, 30 s de annealing a 55°C, 1 min de extensão a 72°C e com 5 min de extensão final.

Os produtos resultantes do PCR foram então submetidos a electroforese num gel de agarose 1% (m/V) usando TBE 0,5x como tampão, durante 40 min a 80 mV. Foi previamente incorporado no gel 0,25x GelRed (Biotium), um corante florescente de ácidos nucleicos para permitir a visualização dos amplicões de PCR após iluminação UV. A visualização foi efectuada utilizando um transiluminador (UVITEC).

Os produtos do PCR foram purificados com o kitExoprostar, de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação foi efectuada uma reacção de pré-sequenciação com recurso a reacção de terminação BigDye. Esta reacção foi efectuada no termociclador com

quatro etapas, 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min e uma etapa final a 72°C por 10 min. Estas amostras foram posteriormente enviadas para a unidade UTI do INSA para sequenciação. As sequências resultantes foram corrigidas com uso do programa BioEdit e depois em comparadas com a biblioteca de dados de nucleótidos de GenBank utilizando o softwareBLASTn para determinar as sequências com maior identidade. Assumiu-se que valores de identidade superiores a 95%, com E-value  $\leq 0$ , correspondiam à espécie do isolado em causa.

### 3.4. Crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi avaliado em microplacas de 96 poços, em que cada isolado foi inoculado no meio *NutrientBrowth* (NB) e cada uma das três variantes de microcistina (MCLR, MCRR e MCYR), que foram adicionadas individualmente à cultura para se obter uma concentração final de 1 nM, 10 nM e 1  $\mu$ M. As concentrações utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir de outros estudos previamente realizados no DSA ASBE-INSA.

Prepararam-se previamente pré-inóculos em 10 mL de meio NB em balões de Erlenmeyer de 100 mL. As células foram incubadas durante a noite a 20°C, num agitador orbital (IKA) a 600 rpm. As experiências de crescimento foram iniciadas no dia seguinte medindo a densidade óptica dos pré-inóculos com o colorímetro 257 (Sherwood) no comprimento de onda de 600 nm.

As microplacas foram então inoculadas com cinco réplicas para cada concentração de microcistinas e para o controlo negativo, com uma densidade óptica inicial de 0,05 para um volume final de 200  $\mu$ L constituído de meio NB, de acordo com a representação na figura 3.2. As microplacas foram incubadas a 20°C com agitação.

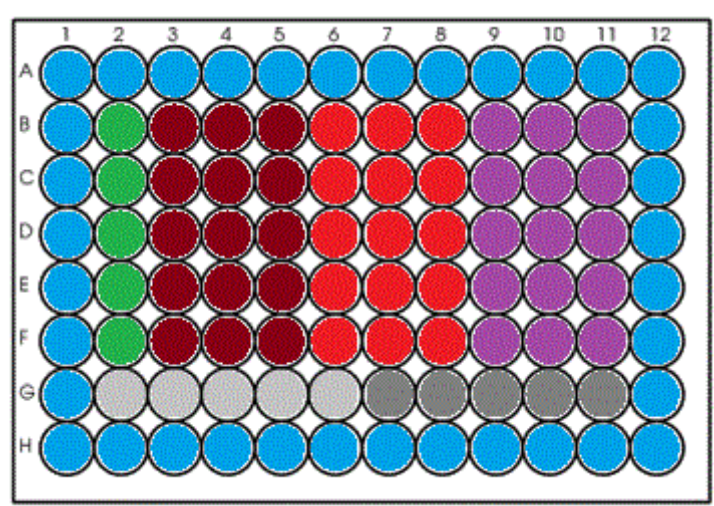


Fig. 3.2: Representação da inoculação das placas, com réplicas em quintuplicado. Cinzento – branco (meio NB), verde - controlo negativo (meio NB + células), castanho - ensaios com MCLR, vermelho – ensaios com MCRR, roxo – ensaios com MCYR, azul - vazios.

As densidades óticas foram medidas a 600 nm de 30 min em 30 min usando o leitor de microplacas MultiskanAscentThermoLabsystems, com agitação rápida durante 5 s. As densidades óticas foram medidas durante um mínimo de 8 h a um máximo de 24 h até os isolados atingirem a fase estacionária. Os dados resultantes das três réplicas biológicas independentes das curvas de crescimentos de cada isolado foram tratados com o programa *Microsoft Office Excel*. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão das densidades óticas medidas. Aplicou-se o teste F e o teste *t* de Student com um nível de significância de  $p < 0,05$  para avaliar diferenças estatisticamente significativas.

### 3.5. Amplificação de genes de degradação da microcistina (*mcr*)

O ADN bacteriano foi extraído de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.3. O PCR realizado para as amplificações dos genes *mcr* utilizou uma mix de 25  $\mu$ L contendo: 2  $\mu$ L de ADN (200-300 ng), tampão de PCR 1x (Invitrogen), 0,025 mM de dNTPs, 5  $\mu$ M de cada primer, 0,05% w-1, 4 mM  $MgCl_2$  e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen). Os primers utilizados estão descritos na tabela 3.2. As reacções foram efectuadas num termociclador Tpersonal (Biometra®) com a tampa aquecida a 95°C, com os seguintes cinco passos: 10 min de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 s de desnaturação a 94°C, 30 s de annealing à temperatura referida na tabela 3.2, 1 min de extensão a 72°C e com 5 min de extensão final.

Tabela 3.2: Lista de primers usado para amplificar os genes de degradação da microcistinas (*mcr*)

Primer	Sequência (5' - 3')	Temperatura de annealing	Referências
mcrAF_Saito	GACCCGATGTTCAAGATACT	47°C	Saito <i>et al</i> , 2003
mcrAR_Saito	CTCCTCCCACAAATCAGGAC		
mcrBf1_Ho	CGACGATGAGATACTGTCC	47°C	Ho <i>et al</i> , 2007
mcrBr1_Ho	CGACGATGAGATACTGTCC		
mcrCf1_Ho	TCCCCGAAACCGATTCTCCA	59°C	Ho <i>et al</i> , 2007
mcrCr1_Ho	CCGGCTCACTGATCCAAGGCT		
mcrDf1_Ho	GCTGGCTGCGACGGAAATG	59°C	Ho <i>et al</i> , 2007
mcrDr1_Ho	ACAGTGTTGCCGAGCTGCTCA		

Os produtos resultantes do PCR foram então submetidos a eletroforese num gel de agarose 1% (m/V) usando TBE 0,5x como tampão durante 40 min a 80 mV. Foi previamente incorporado no gel 0,25x GelRed (Biotium), um corante fluorescente de ácidos nucleicos para permitir a visualização dos amplicões de PCR após iluminação UV. A visualização foi efetuada utilizando um transiluminador (UVITEC).

Os produtos do PCR foram purificados com o kit Exopostar, de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação foi efetuada uma reação de pré-sequenciação com recurso a reação de terminação BigDye. Esta reação foi realizada no termociclador com quatro etapas, 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min e uma etapa final a 72°C por 10 min. Estas amostras foram posteriormente enviadas para a unidade UTI do INSA para sequenciação. As sequências resultantes foram corrigidas com uso do programa BioEdit e depois em comparadas com a biblioteca de dados de nucleótidos de GenBank utilizando o software BLASTn para

determinar as sequências com maior identidade. Assumiu-se que valores de identidade superiores a 95%, com E-value  $\leq 0$ , correspondiam ao gene em causa.

### 3.6. Determinação das actividades enzimáticas do sistema antioxidante

Foi medida a atividade enzimática de duas enzimas do sistema antioxidante - a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Para determinar a atividade enzimática prepararam-se quatro frascos para cada isolado contendo 15 mL de meio NB e o isolado a uma densidade ótica inicial de 0,05, sendo um frasco o controlo negativo, e nos restantes três foi adicionada uma das três variantes de microcistina em análise (MCLR, MCRR, MCYR) de modo a ficarem com uma concentração final de 10 nM. Os frascos foram incubados durante 12 h a uma temperatura de 20°C, com agitação. De seguida prepararam-se duas alíquotas, uma de 10 mL para o ensaio da SOD e outra de 5 mL para o ensaio da CAT, que foram centrifugadas a 1500 rpm e os *pellets* conservados a -80°C até serem usados.

As proteínas totais dos *pellets* referidos acima foram extraídas em 300  $\mu$ L de tampão fosfato (0,08 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,0015 M EDTA, 0,0017 M  $\text{NaN}_3$ ) e com a adição de microesferas de vidro (Sigma) seguindo-se seis ciclos alternados de 1 min de agitação no vortex e 1 min em gelo. A seguir centrifugou-se a 10000 rpm por 20 min (para depositar os restos celulares) e recolheu-se o sobrenadante para os ensaios enzimáticos. As proteínas totais nas amostras foram estimadas pelo método de Bradford em microplaca, onde a absorvância foi medida a 600 nm e comparada com uma curva padrão de albumina de soro de bovino (BSA) utilizando as seguintes concentrações 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL.

A atividade da CAT medida a partir do ritmo de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que foi medido diretamente pelo decréscimo de absorvância a 240 nm no espectrofotómetro UV4 UNICAM. A mistura reacional foi de um volume total de 3 mL, contendo tampão de fosfato de sódio a 50 mM (pH 7), 1 mL de 0,2% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 5  $\mu$ g de extrato enzimático.

A atividade da SOD total, SOD1 e SOD2 foi medida a partir da taxa de inibição da formação de *NBT-diformazan* utilizando o kit de ensaio da superóxido dismutase (Trevigen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com uma solução gelada de clorofórmio / etanol a 37,5/62,5 (v/v), agitadas manualmente durante 30 s e foram posteriormente centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm. A fase aquosa (camada superior) foi recuperada sem tocar na segunda fase formada, e colocada num novo Eppendorf. Para avaliar a atividade SOD2, retirou-se uma alíquota da fase aquosa anterior e adicionou-se KCN a uma concentração final de 2 mM. O ião cianeto inibe mais do que 90% da actividade SOD1, de acordo com as instruções do fabricante do kit de ensaio (Trevigen). Para determinar a atividade das SODs de cada isolado, usaram-se 5  $\mu$ g de extrato enzimático na mistura de reação num espectrofotómetro UV4 (UNICAM) a 550 nm, de acordo com as instruções do kit.

## 4. Resultados



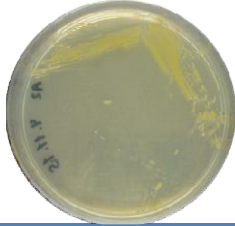



## 4.1. Caracterização dos isolados

Os isolados bacterianos foram nomeados com letras e números de acordo com a localização da sua recolha para posterior identificação (A- Albufeira do Alvito, O – Barragem de Odivelas, R – Albufeira do Roxo).

As características macroscópicas avaliadas foram a cor e textura das colónias, e utilizaram-se os seguintes termos para o registo da coloração que se encontra na tabela 4.1: amarelo claro, amarelo-torrado, branco, branco opaco. Os tipos de textura observados registaram-se de acordo com: mucoso, muito mucoso, mucoso e rugoso (tabela 4.1).

As características microscópicas avaliadas foram a coloração Gram e a forma bacteriana, sendo esta última dividida em bacilos e cocobacilos. A coloração de Gram foi feita com recurso a uma máquina de coloração automática, Previ™ color Gram (Biomérieux), tendo os resultados revelado que os isolados são todos Gram negativos. A identificação molecular foi feita com a análise de sequências bacterianas dos isolados no software BLASTn.

Tabela 4.1: Dados macroscópicos dos isolados utilizados neste trabalho.

Isolado	Imagem macroscópica	Coloração	Características morfológicas
A2		Amarelo-torrado	Mucosa
A3		Branco opaco	Mucosa, rugosa
O2		Amarelo-torrado	Pouco mucosa
O3		Branco opaco	Pouco mucosa



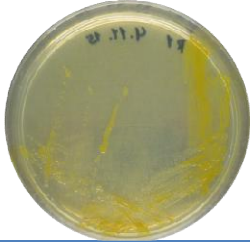
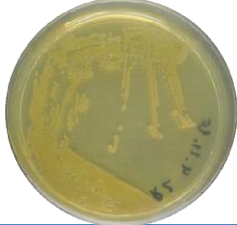
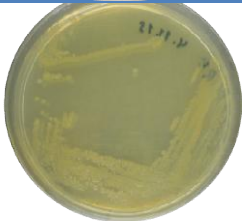
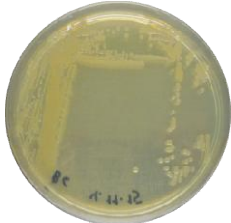
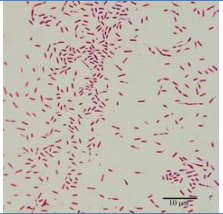
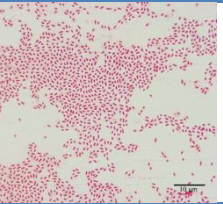

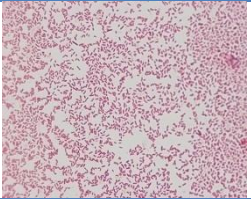
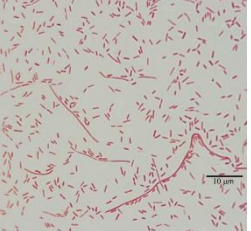
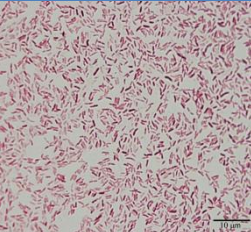
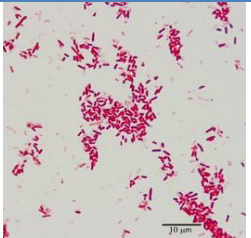
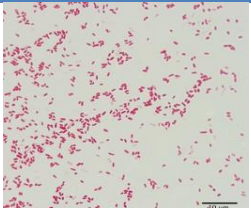
<b>R1</b>		Amarelo-torrado	Mucosa
<b>R2</b>		Amarelo claro	Mucosa
<b>R4</b>		Branco	Pouco mucosa
<b>B6</b>		Branco	Mucosa

Tabela 4.2: Dados da identificação molecular e microscópios dos isolados utilizados neste trabalho\*.

<b>Isolado</b>	<b>Identificação molecular</b>	<b>Tipo de coloração Gram</b>	<b>Imagem microscópica</b>	<b>Forma celular</b>
<b>A2</b>	<i>Flavobacterium</i>	Negativo		Bacilos
<b>A3</b>	<i>Yersina</i>	Negativo		Cocobacilos
<b>O2</b>	<i>Flavobacterium</i>	Negativo		Bacilos

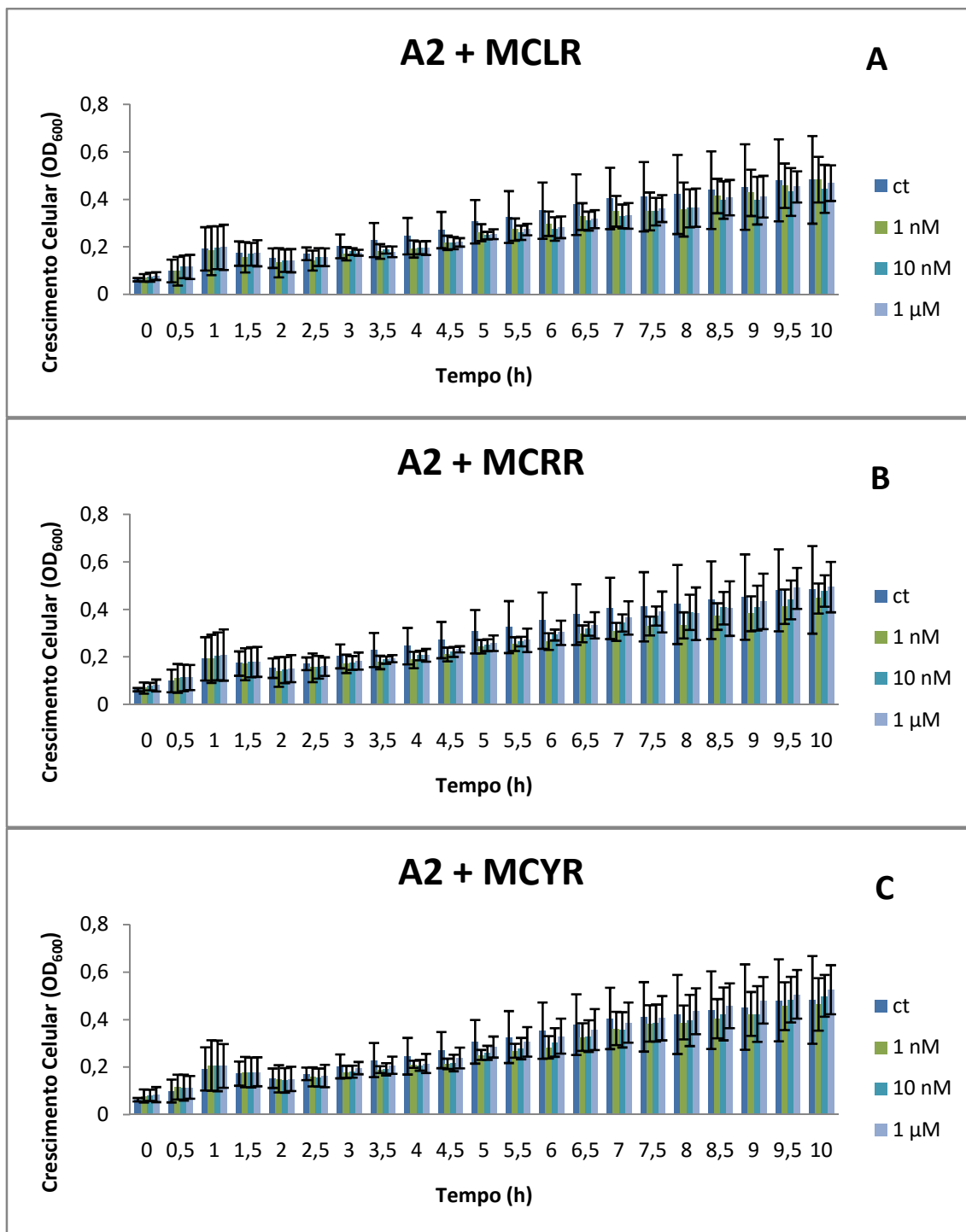


<b>O3</b>	<i>Pseudomonas</i>	Negativo		Cocobacilos
<b>R1</b>	<i>Flavobacterium</i>	Negativo		Bacilos
<b>R2</b>	<i>Vogesella</i>	Negativo		Cocobacilos
<b>R4</b>	<i>Pseudomonas</i>	Negativo		Cocobacilos
<b>B6</b>	<i>Aeromonashydrophila</i>	Negativo		Cocobacilos

**Legenda:\*** A identificação molecular resulta da sequenciação do gene 16S e os restantes dados provêm da avaliação da coloração Gram e análise microscópica dos isolados.

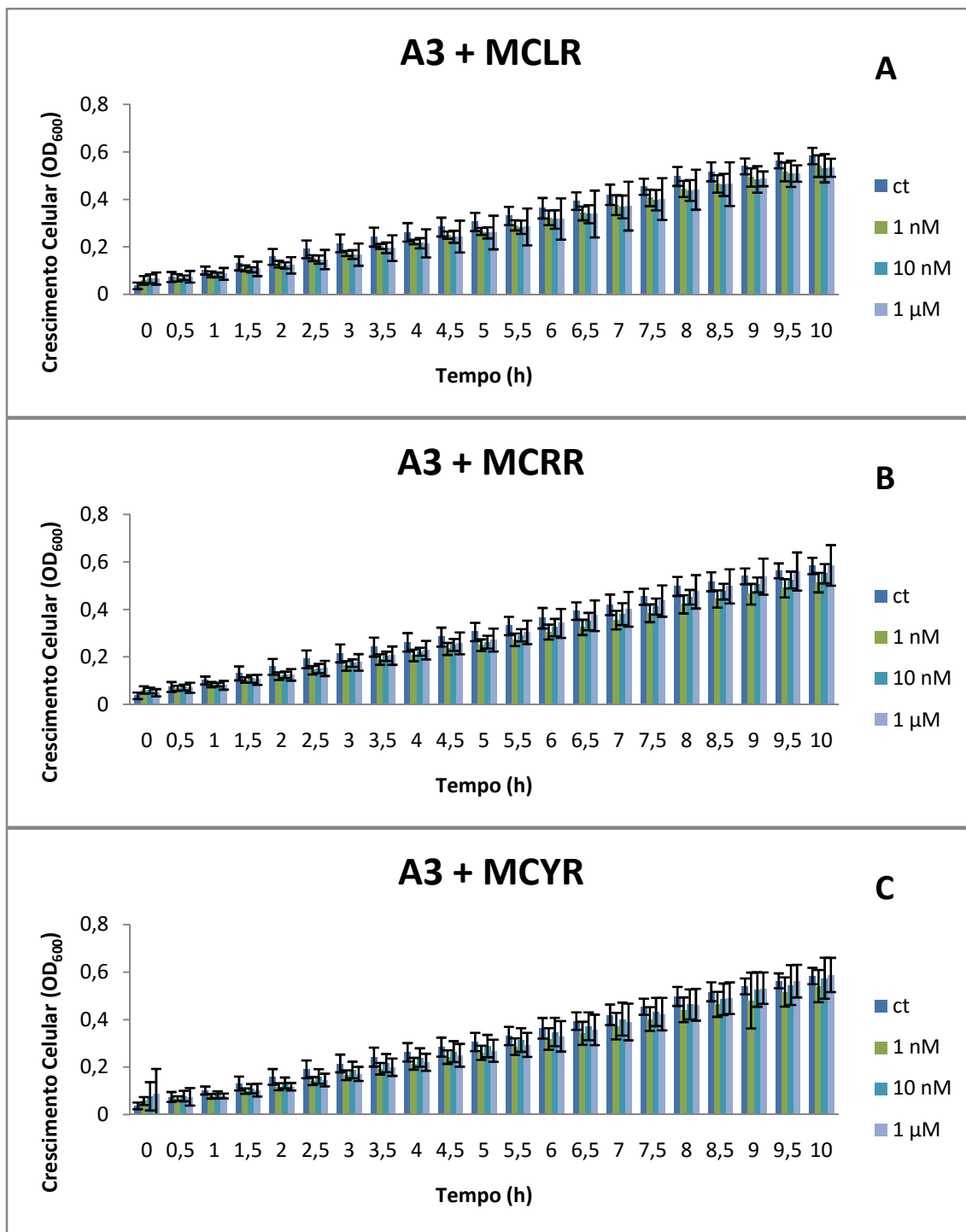
## 4.2. Curvas de crescimento

Os isolados foram expostos a três concentrações diferentes (1 nM, 10 nM, 1 µM) de cada variante de microcistina (MCLR, MCRR e MCYR), como se pode verificar nas Figuras 4.1 a 4.6. Os resultados são retirados da comparação do controlo contra os ensaios das variantes. Verificou-se que as três variantes de microcistina testadas tiveram diferentes impactos no crescimento dos isolados, alguns de acordo com a concentração de cada variante e entre as variantes de microcistina, existindo isolados que só são inibidos por uma variante, e outros que possuem inibição só na concentração intermédia. O efeito da presença das microcistinas no crescimento bacteriano só aparece após o final da fase *lag* de um modo geral. Neste trabalho apenas se observaram efeitos inibitórios no crescimento bacteriano, ao contrário do reportado em Miguéns & Valério, 2015, em que alguns isolados apresentaram um estímulo (aumento) do crescimento.



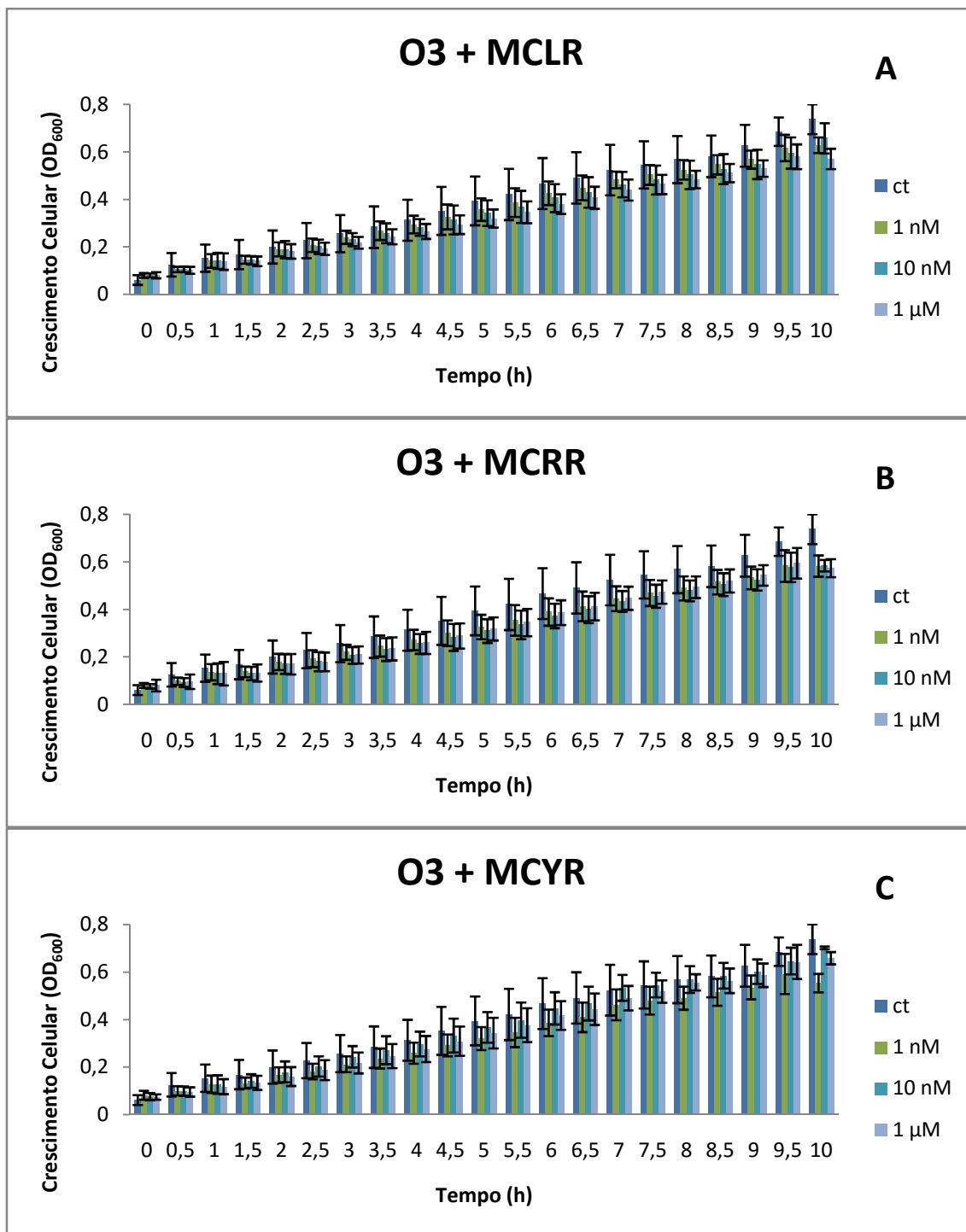
**Fig. 4.1:** Gráficos das curvas de crescimento do isolado A2 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

Relativamente ao isolado A2 (*Flavobacterium*), observou-se uma inibição estatisticamente significativa a partir das 3 horas até ao final do ensaio em todos os casos exceto no caso da MCYR a 1 μM que não apresenta inibição significativa em comparação com o controlo durante todo o ensaio (Fig. 4.1).



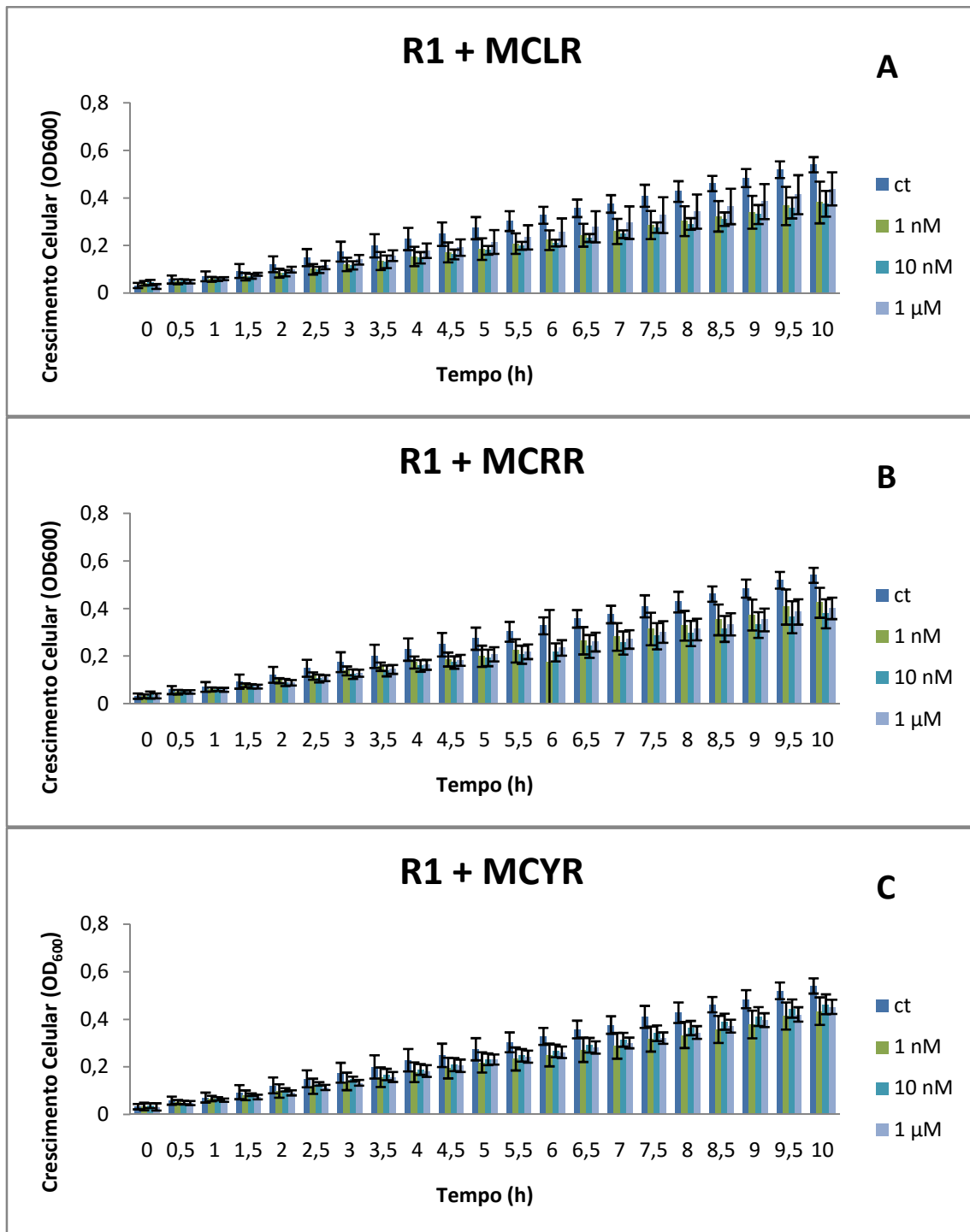
**Fig. 4.2:** Gráficos das curvas de crescimento do isolado A3 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

No ensaio de exposição do isolado A3 (*Yersinia*) com MCLR existe inibição estatisticamente significativa em todos os pontos (Fig4.2.A). Por outro lado, no ensaio com MCRR existem diferenças estatisticamente significativas em todos os pontos das concentrações a 1 nM e 10 nM mas não na concentração 1 μM onde só existe impacto nos pontos entre a 1 hora até às 5,5 horas (Fig. 4.2.B). No ensaio com MCYR existem diferenças estatisticamente significativas em todos os pontos das concentrações a 1 nM e 1 μM, mas não na concentração 10 nM onde só existe impacto nos pontos entre a 1 hora até às 4 horas (Fig. 4.2.C).



**Fig. 4.3:** Gráficos das curvas de crescimento do isolado O3 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

Relativamente à exposição do isolado O3 (*Pseudomonas*) com MCLR, na concentração mais baixa (1 nM) não existe efeito estatisticamente significativo até às 5 horas do ensaio, enquanto na concentração de 10 nM a inibição acontece mais cedo, às 4 horas e na concentração de 1 μm observa-se uma ligeira inibição significativa durante todo o ensaio (Fig. 4.3.A). Na presença da variante MCRR existe inibição estatisticamente significativa em todos os ensaios (Fig. 4.3.B), enquanto com a variante MCYR existe inibição estatisticamente significativas durante todo o ensaio na concentração de 1nM e a 1 μM, mas a 10 nM não existe um efeito estatisticamente significativo em relação ao controlo (Fig. 4.3.C).



**Fig. 4.4:** Gráficos das curvas de crescimento do isolado R1 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

Em todos os ensaios de crescimento do isolado R1 (*Flavobacterium*) na presença das várias variantes de microcistina verificou-se uma inibição significativa desde o final da fase lag, a cerca de 1 hora e meia (Fig. 4.4).

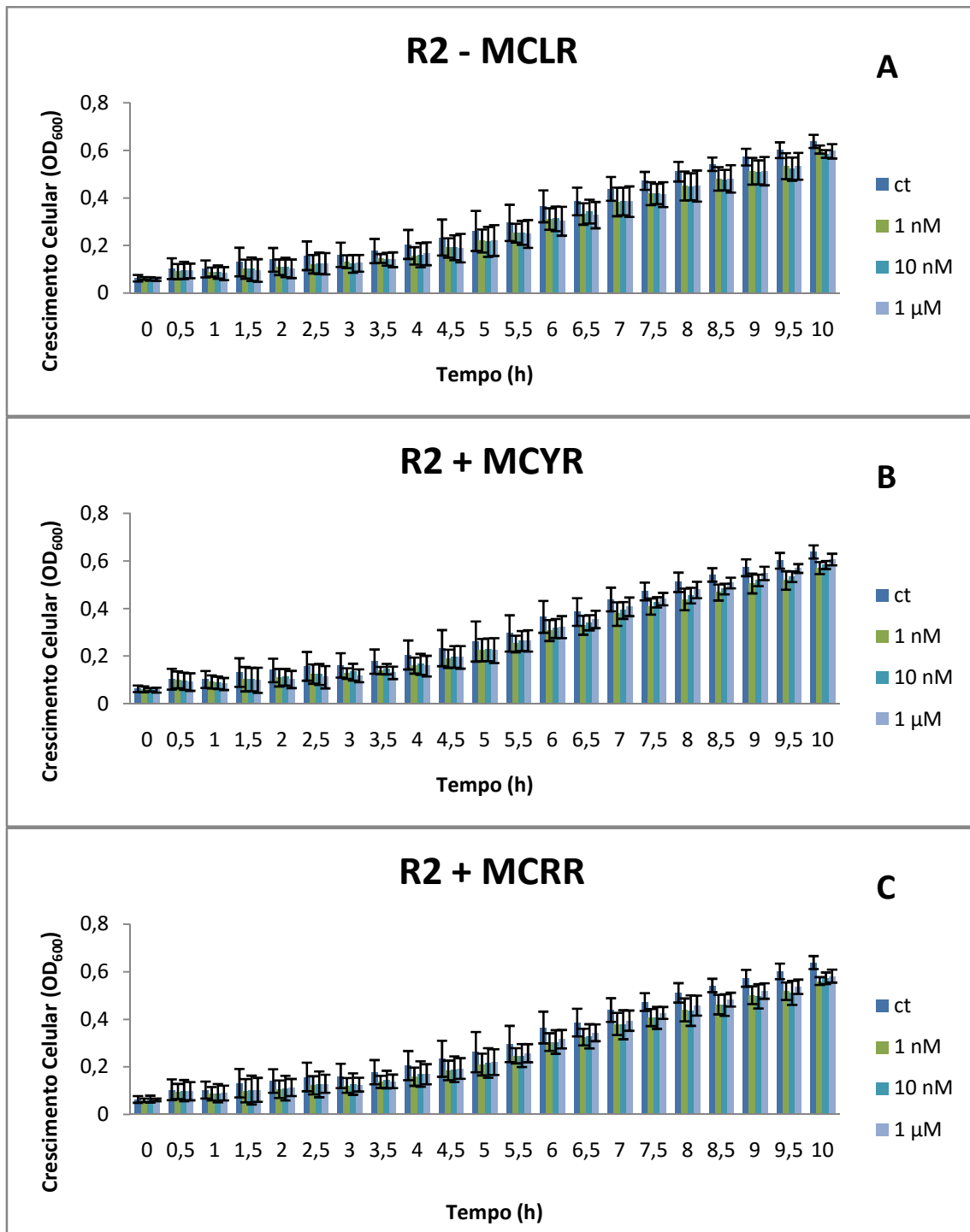
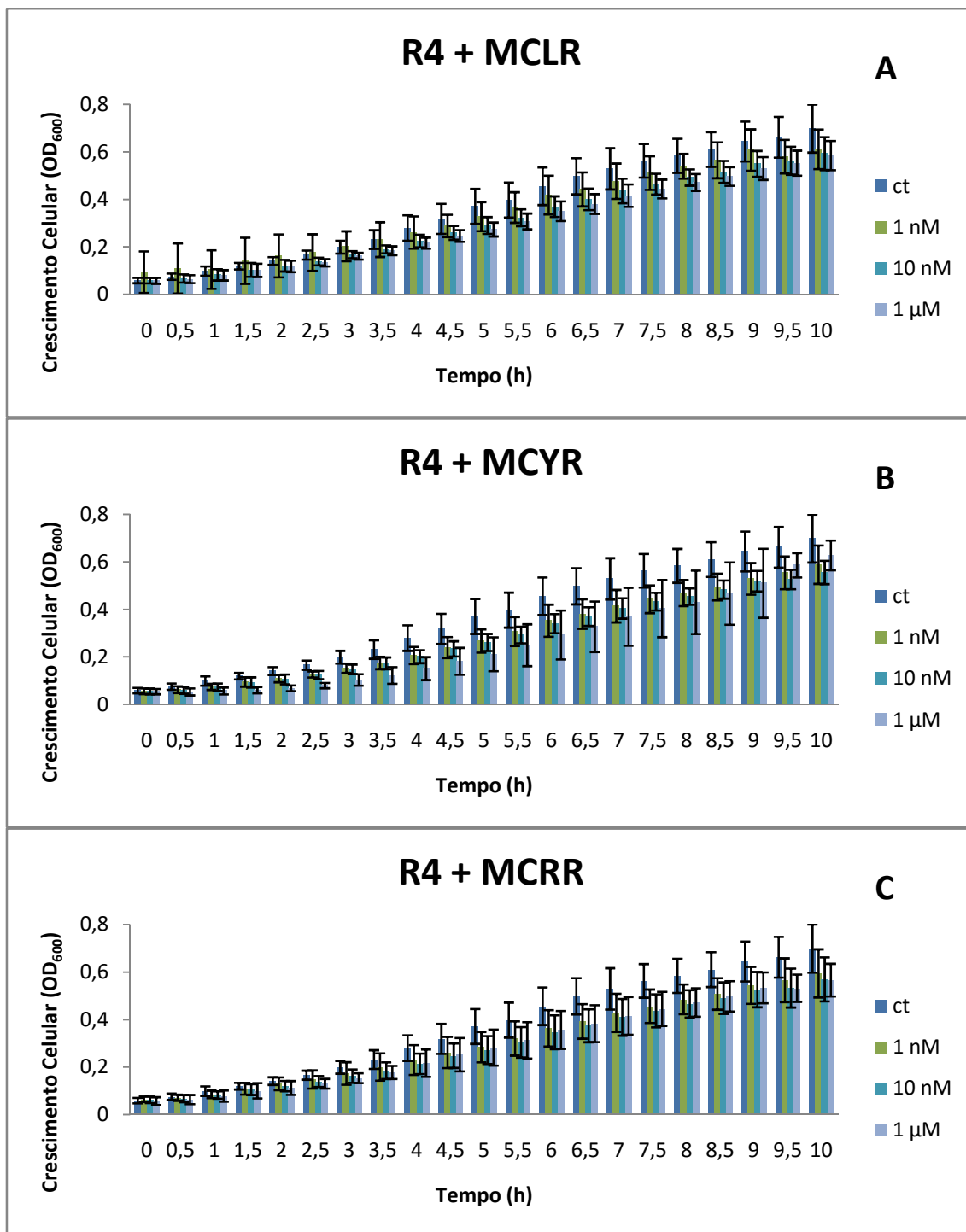


Fig. 4.5: Gráficos das curvas de crescimento do isolado R2 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

Em todos os ensaios de crescimento do isolado R2 (*Vosegella*) na presença das várias variantes de microcistina verificou-se uma inibição significativa desde o final da fase lag, a cerca de 1 hora e meia (Fig. 4.5).



**Fig. 4.6:** Gráficos das curvas de crescimento do isolado R4 com as diferentes variantes de microcistinas. Os valores apresentados são a média + desvio padrão dos ensaios em triplicado.

Nos ensaios de crescimento referentes ao isolado R4 (*Pseudomonas*), na presença da variante MCLR, o ponto onde se vê inibição estatisticamente significativa reduz com a concentração sendo às 4,5 horas na presença de 1 nM, 2 horas com 10 nM e 1 hora com 1 μM (Fig. 4.6.A). Na presença da variante MCRR, o ponto onde se vê inibição estatisticamente significativa reduz com a concentração sendo às 3 horas a 1 nM, 2 horas a 10 nM e 1 hora a 1 μM (Fig. 4.6.B). No caso da exposição com a variante MCYR, observou-se inibição estatisticamente significativa em todo o ensaio (Fig. 4.6.C).

### 4.3. Genes *mlr*

A presença dos genes do grupo *mlr* foi pesquisada nos 7 isolados utilizados neste trabalho, e os resultados obtidos são apresentados na seguinte tabela 4.3.

**Tabela 4.3: Presença de genes *mlr* nos isolados**

Isolado	Género	<i>mlrA</i>	<i>mlrB</i>	<i>mlrC</i>	<i>mlrD</i>
A2	<i>Flavobacterium</i>				
A3	<i>Yersinia</i>	Presente	Possível presença		Possível presença
O2	<i>Flavobacterium</i>	Possível presença	Presente		
O3	<i>Pseudomonas</i>			Possível presença	
R1	<i>Flavobacterium</i>				Possível presença
R2	<i>Vogesella</i>				Possível presença
R4	<i>Pseudomonas</i>				

**Nota:** Nos casos em que se refere “Possível presença”, significa que houve amplificação de um fragmento com dimensões próximas do esperado, mas não se conseguiu sequenciar para confirmar a identificação do fragmento do gene.

Os resultados da pesquisa destes genes não foram muito expressivos pois não foi possível amplificar e obter sequências com qualidade das bandas encontradas, apesar de se ter tentado otimizar várias condições de PCR, tal como alterações das temperaturas de *annealing*, e concentração de MgCl<sub>2</sub> usada. Ainda assim foi confirmada a presença de um gene do complexo *mlr* em dois dos isolados (A3 e O2), que apesar que não se ter conseguido confirmar a presença dos restantes podemos supor que existe uma possibilidade forte destes isolados os possuírem, devido à necessidade do isolado ter o complexo completo para conseguir degradar completamente as microcistinas.

### 4.4. Atividades enzimáticas

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada após um período de exposição de 12 horas para cada uma das três variantes de microcistinas (MCLR, MCRR, MCYR) como descrito no capítulo dos materiais e métodos, estando os resultados preliminares obtidos neste trabalho expostos na tabela 4.4.

**Tabela 4.4: Atividades relativas da catalase**

Isolado	Género	Controlo	MCLR	MCRR	MCYR
A2	<i>Flavobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
A3	<i>Yersinia</i>	1,0	2,0	2,5	1,8
O3	<i>Pseudomonas</i>	1,0	0,0	0,0	0,3
R1	<i>Flavobacterium</i>	1,0	1,0	0,0	3,0
R2	<i>Vogesella</i>	1,0	0,7	0,5	0,5
R4	<i>Pseudomonas</i>	1,0	0,4	1,1	0,8



Os resultados do teste da atividade enzimática da CAT demonstram uma grande variação do tipo de resultados. Por um lado, houve isolados que apresentaram uma diminuição da sua atividade catalítica (O3, R2 e R4 para MCLR e MCYR), enquanto no isolado A3 (*Yersina*) este apresenta uma atividade significativamente aumentada e no isolado A2, que não aparenta possuir a enzima CAT, recorrendo possivelmente a outras enzimas para a defesa antioxidante. Existe também alguma variedade da ação das diferentes microcistinas testadas no mesmo isolado, sendo o caso mais notório o isolado R4 e R1, sendo que no primeiroa exposição a MCRR induziu uma atividade da CAT aumentada enquanto com MCLR e MCYR houve diminuição da atividade catalítica. Já no caso do isolado R1 não há variação da atividade catalítica na presença de MCLR, há uma inibição total com MCRR e no caso da exposição a MCYR, a atividade aumentou consideravelmente.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada após um período de exposição de 12 horas a cada uma das três variantes de microcistinas (MCLR, MCRR, MCYR) como descrito no capítulo dos materiais e métodos. Devido a dificuldades de obtenção de extrato proteico em quantidade suficiente para testar as atividades da SOD1 e SOD2, os resultados preliminares expostos na tabela 4.5 correspondem apenas à SOD total (SOD1+SOD2).

**Tabela 4.5: Atividades relativas da SODtotal**

<b>Isolado</b>	<b>Género</b>	<b>Controlo</b>	<b>MCLR</b>	<b>MCRR</b>	<b>MCYR</b>
<b>A2</b>	<i>Flavobacterium</i>	1,0	1,3	0,5	0,5
<b>R1</b>	<i>Flavobacterium</i>	1,0	1,5	2,0	1,5
<b>R2</b>	<i>Vogesella</i>	1,0	0,9	1,6	1,6
<b>R4</b>	<i>Pseudomonas</i>	1,0	1,0	0,0	0,4

Os resultados preliminares do teste da SOD diferem bastante entre os isolados analisados. No isolado A2 existe um acréscimo da atividade da SOD na presença da MCLR mas uma inibição na presença da MCRR e MCYR. No isolado R1 existe um aumento da atividade da SOD com todas as variantes de MC testadas. No isolado R2 a presença de MCLR induziu uma ligeira inibição da SOD, enquanto a presença de MCRR ou MCYR provocou um aumento considerável de atividade da SOD. No isolado R4 a MCLR revelou não ter impacto neste isolado, enquanto a MCRR e MCYR induziram diminuições acentuadas de atividade destas enzimas.

## 5. Discussão

As cianobactérias e as bactérias heterotróficas são partes bastante substanciais dos ecossistemas aquáticos, pelo que estudos que ajudem a elucidar a interação entre as mesmas são bastante importantes. Este trabalho vem continuar o estudo previamente iniciado em Miguéns & Valério (2015) para oferecer respostas a questões que aí surgiram, nomeadamente se as espécies *Aeromonashydrophyla* e *Flavobacterium* seriam especialmente resistentes a microcistinas e qual a razão dessa resistência.

Para este efeito foram selecionados para isolamento colónias que possuíam as características morfológicas correspondentes a estas espécies, ou seja, colónias com pigmentação amarelo forte (potencialmente *Flavobacterium*) e brancas mucosas (potencialmente *Aeromonashydrophyla*), sendo então escolhidos sete isolados, os quais foram identificados como: três são *Flavobacterium*, duas *Pseudomonas*, uma *Yersina* e uma *Vosegela*. Houve alguns problemas com o crescimento em meio líquido de alguns isolados, particularmente o isolado O2, não sendo por isso possível realizara maioria dos ensaios.

A avaliação do efeito das três variantes mais comuns de microcistinas (MCLR, MCRR e MCYR) no crescimento dos isolados obtidos revelou não ter grande impacto. Já anteriormente Miguéns & Valério (2015) verificaram que a maioria dos isolados testados apenas revelou alguma inibição significativa do crescimento a concentrações de microcistinas bastante elevadas (1 µM), que não são habitualmente encontradas na natureza (Ernst et al. 2001; Valério et al., 2008). Por outro lado, é de referir que a concentração mais elevada testada neste trabalho corresponde à menor testada por Yang (2014) em que também não observou uma inibição significativa do crescimento.

Foi feita uma pesquisa à presença de genes *mlr* para avaliar se esta seria a fonte das resistências encontradas às microcistinas, mas infelizmente não foi possível confirmar a presença dos genes na maioria dos isolados. Uma das razões que podemos apontar para este problema é o facto de estes genes estarem sequenciados principalmente em bactérias do género *Sphingomonas*, o que pode levar a que os primers utilizados possam ter problemas de *annealing* com os géneros das bactérias aqui testados e conseqüentemente não tenham permitido obter os amplicões respetivos.

De seguida tentou-se avaliar se existia degradação de microcistina ao longo do crescimento com recurso a análises no HPLC, mas como as concentrações de microcistinas utilizadas eram baixas, tornou-se impossível quantificá-las de modo eficaz com esta metodologia. Verificou-se que a amostra do meio NB contendo 1µM estava abaixo do limite de deteção para ser registada convenientemente no HPLC, mas quando se tentou concentrar a amostra no *speedvac*, o nível de interferências devido aos restantes componentes do meio foi demasiado grande, não se conseguindo obter um cromatograma limpo.

O passo seguinte foi a avaliação da atividade enzimática da CAT e da SOD. Nos ensaios da determinação da atividade enzimática da catalase, quatro dos seis isolados apresentaram uma redução na atividade da CAT na presença de microcistinas com diferenças no impacto da inibição entre as variantes (O3,R1,R2,R4), um isolado apresentou um aumento da actividade enzimática (A3) e um isolado revelou não possuir a enzima (A2). Verificou-se que alguns dos isolados (R1,R4) possuíam diferentes resultados de acordo com a variante de microcistina

utilizada. Uma razão para a diferença de impacto na actividade enzimática pode resultar das diferenças entre as hidrofobicidades destas variantes, sendo a MCLR a mais hidrofóbica e a MCRR a menos hidrofóbica, das três variantes testada (Dawson, 1998; Maagdet *al.*, 1999).

No ensaio da determinação da actividade enzimática da SOD obtiveram-se resultados semelhantes aos da CAT, no qual se observam diferenças consideráveis entre o impacto das diferentes variantes de microcistina. Neste caso também se pode supor que estas variações são possivelmente causadas pelas diferenças de hidrofobicidades destas três variantes (Dawson, 1998), que leva possivelmente a um maior impacto da MCRR e MCYR devido à indução de mais ROS intracelulares, podendo justificar até a inibição da enzima devido a um excesso de substrato.

## 6. Conclusão e Considerações Finais

Como conclusões finais do trabalho realizado, pode afirmar-se que as bactérias heterotróficas que têm sido isoladas no Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, têm revelado não apresentar uma inibição profunda do seu crescimento na presença de qualquer uma das três variantes mais comumente encontradas de microcistinas (MCLR, MCRR e MCYR).

Este trabalho permitiu perceber que não se observa sempre o mesmo padrão de resposta para cada variante de microcistina, nem o mesmo padrão dentro das várias estirpes da mesma espécie com as três variantes de MC. Contudo, podemos observar algumas tendências. A variante MCLR (a mais hidrofóbica) provocou, na maioria dos casos, uma inibição da catalase e um aumento da actividade catalítica da SOD. Porém consegue-se observar que tendencialmente, pelo menos uma das enzimas do sistema antioxidante é ativada, o que faz supor que a ativação das enzimas do sistema antioxidante será um dos mecanismos principais para combater os efeitos da presença das MCs.

Não se conseguiu ainda concluir com as análises efetuadas, devido às limitações do desenho dos *primers* já abordadas, se a presença de genes *mlr* também pode contribuir para a resistência das bactérias heterotróficas à inibição do crescimento pela presença de microcistinas no meio onde se encontram.

Os comportamentos observados parecem indicar que estão mais relacionados com especificidades da estirpe, não havendo um comportamento semelhante entre os isolados da mesma espécie. Contudo tendo em conta que não se conseguiu isolar no máximo mais do que dois isolados de cada espécie, esta tendência deveria ser confirmada num número mais alargado de estirpes, em pelo menos uma das espécies.

Devido ao facto deste tema de trabalho se inserir numa área ainda pouco explorada, não existem muitas informações acerca deste tema. Contudo, não se pode deixar de destacar a relevância do tema e a importância de continuar a investigar esta temática, devido à necessidade que existe de perceber o impacto da presença das cianotoxinas nos ecossistemas do meio aquático.

## 7. Bibliografia

- Abbott, S. L.; Cheung, W. K. W.; Janda, J. M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J. Clin. Microbiol.*, **2003**, 41(6), 2348–2357.
- Beardall, J.; Raven, J.A. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycol.* **2004**, 43,26–40.
- Berg, K.A.; Lyra, C.; Sivonen, K.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Tuomi, P.; Rapala, J. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* **2009**, 3, 314–325.
- Bláha, L.; Babica, P.; Marsálek, B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdiscip. Toxicol.* **2009**, 2(2), 36–41.
- Bláhová, L.; Babica, P.; Adamovský, O.; Kohoutek, J.; Maršálek, B.; Bláha, L. Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environ. Chem. Lett.* **2008**, 6,223–227.
- Bourne, D.G.; Jones, G.J.; Blakeley, R.L.; Jones, A.; Negri, A.P.; Riddles, P. Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 4086–4094.
- Bourne, D.G.; Riddles, P.; Jones, G.J.; Smith, W.; Blakeley, R.L. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of cyanobacterial microcystin LR. *Environ. Toxicol.* **2001**, 16(6),523-534.
- Campos, A.; Araujo, P.; Pinheiro, C.; Azevedo, J.; Osorio, H.; Vasconcelos, V. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystins and cylindrospermopsin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, 94, 45-53.
- Chen, X.; Yang, X.; Yang, L.; Xiao, B.; Wu, X.; Wang, J.; Wan, H. An effective pathway for the removal of microcystin LF via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Res.* **2010**, 44(6),1884.
- Chorus, I.; Falconer, I.R.; Salas, H.J.; Bartram, J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health* **2000**, 3, 323–347.
- Codd, G.A.; Morrison, L.F.; Metcalf, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 203, 264–272.
- Dawson, R.M. Review article the toxicology of microcystins. **1998**, 36, 953–962.
- Ding, W.; Ong, C. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 220, 1-7.
- Ernst, B.; Hitzfeld, B.; Dietrich, D.; Al, E. E. T. Presence of *Planktothrix* sp. and Cyanobacterial Toxins in Lake Ammersee, Germany and their Impact on Whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) *Environ Toxicol.* **2001**, 16(6), 483–488.
- Figueiredo, D.; Pereira, M.; Moura, A.; Silva, L.; Barrios, S.; Fonseca, F.; Henriques, I.; Correia, A. Bacterial community composition over a dry winter in meso- and eutrophic Portuguese water bodies. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, 59, 638–650.
- Francis, G. Poisonous Australian lake. *Nature* **1878**, 18, 11-12.

- Harada, K.I.; Tsuji, K.; Watanuki, T.; Kondo F.; Watanabe, M.F.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Uchida, H. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. *Phycol.* **1996**, *35*, 83-88.
- Ho, L.; Hoefel, D.; Saint, C. P.; Newcombe, G. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Res.* **2007**, *41*, 4685–4695.
- Hodgkinson, B. P.; Allen, J. L.; Forrest, L. L.; Goffinet, B.; Sérusiaux, E.; Andrésson, Ó. S.; Miao, V.; Bellenger, J. P.; Lutzoni, F. Lichen-symbiotic cyanobacteria associated with *Peltigera* have an alternative vanadium-dependent nitrogen fixation system. *Eur. J. Phycol.* **2014**, *0262*, 11–19.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A; Staley, J.T.; Williams S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. **1994**, Williams & Wilkins, Baltimore, MD
- Jia, Y.; Du, J.; Song, F.; Zhao, G.; Tian, X. A fungus capable of degrading Microcystin-LR in the algal culture of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 987–996.
- Jones, G.; Bourne, D.; Blakeley, R.; Doelle, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystins by aquatic bacteria. *Nat Toxins* **1994**, *2*, 228–235
- Kim, H.; Lee, J.; Hah, Y.; Roe, J. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147. *Microbiology* **1994**, *140*:3391-3397.
- Li, H.; Xie, P.; Zhand, D.; Chen, J. The first study on the effects of microcystin-RR on gene expression profiles of antioxidant enzymes and heat shock protein-70 in *Synechocystis sp.* *Toxicon* **2009**, *53*, 595-601.
- Maagd, P. G. D. E.; Hendriks, A. J. A. N.; Seinen, W.; Sijm, D. T. H. M. pH-dependently hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. **1999**, *33*, 677–680.
- Miguéns, D.; Valério, E. The impact of some microcystins on the growth of heterotrophic bacteria from Portuguese freshwater reservoirs. *Limnetica* **2015**, *34*(1), 215-226.
- Nadis, S. The cells that rule the seas. *Sci. Am.* **2003**, *289*, 52–53.
- Pearson, L.; Mihali, T.; Moffit, M.; Kellmann, R.; Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* **2010**, *8*(5), 1650-1680.
- Pflugmacher, S. promotion of oxidative stress in *C. demersum* due to exposure to cyanobacterial toxin. *Aquat. Toxicol.* **2004**, *3*, 169-178.
- Radha, P. Antioxidant responses evoked in vitro and in vivo by *Bacopa monnieri* leaf extracts. Ph.D. Thesis. Avinashilingam Deemed University for Women, Coimbatore, India **2010**.
- Saito, T.; Okano, K.; Park, H. D.; Itayama, T.; Inamori, Y.; Neilan, B. A.; Burns, B. P.; Sugiura, N. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *229*, 271–276.
- Sivonen, K.; Jones, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. London: E&FN Spon **1999**, pp, 41–111.
- Stewart, I.; Webb, P. M.; Schluter, P. J.; Shaw, G. R. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports,

- epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ. Health* **2006**, *24*, 5-6.
- Sutton, S. The gram stain. *PMF Newsletter* **2006**, *12(2)*, 4.
  - Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; Von Dohren, H.; Borner, T.; Neilan, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystisaeruginosa* PCC7806: An integrated peptide-polyketidesynthetase system. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 753–764.
  - Turner, S.; Pryer K.M.; Miao V.P.; Palmer J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **1999**, *46(4)*, 327–338
  - Valério, E.; Faria, N.; Paulino, S.; Pereira, P. Seasonal variation of phytoplankton and cyanobacteria composition and associated microcystins in six Portuguese freshwater reservoirs. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim* **2008**, *44(3)*, 189–196.
  - Van der Kooj, D. Properties of Aeromonads and their occurrence and hygenic significance in drinking water. *Zentralb. Bakt. Hyg. B.* **1988**, *187*, 1–17.
  - Wang, Q.; Su, M.F.; Zhu, W.Q.; Li, X.N.; Jia, Y.; Guo, P.; Chen, Z.H.; Jiang, W.X. Growth Inhibition of *Microcystis Aeruginosa* by White-rot Fungus *Lopharia spadicea*. *Water Sci. Technol.* **2010**, *62*, 317–323.
  - Welker, M.; von Dohren, H. Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 530–563.
  - WHO. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. *Routledge: London and New York.* **1999**.
  - WHO. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1 – Costal and fresh waters. **2003**
  - Wiegand, C.; Pflugmacher, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *203*, 201–218.
  - Yang, F.; Zhou, Y.; Sun, R. Biodegradation of microcystin-LR and-RR by a novel microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu. *Biodegradation* **2014**, 447–457.

## 8. Sitiografia

- Arizona (2016) <http://ag.arizona.edu/azaqua/algaeclass/algaedraw/PSALG.JPG>, acedido 26.09.2016
- NASA (2016) Bloom. <http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=41385>, acedido 06.08.2016