U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Monitorização de cianobactérias e cianotoxinas nas lagoas Portuguesas de Mira e Vela comparando métodos moleculares, imunológicos e volumes de amostragem

Marisa Alexandra Marques de Freitas

Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais

Porto, 2009

Marisa Alexandra Marques de Freitas

Monitorização de cianobactérias e cianotoxinas nas lagoas Portuguesas de Mira e Vela comparando métodos moleculares, imunológicos e volumes de amostragem

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

Orientador – Doutor Vítor Manuel Vasconcelos

Categoria – Professor catedrático

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Agradecimentos

É com grande consideração que agradeço toda a disponibilidade, atenção e apoio do meu orientador **Professor Vítor Vasconcelos.** Muito obrigada pelos seus sábios conselhos.

Gostaria também de manifestar a minha gratidão com o **António Martins**, pela presença constante, apoio incansável, simpatia e partilha do seu conhecimento ao nível da genética microbiana, tornando este trabalho numa experiência extremamente agradável e enriquecedora.

Não posso deixar de agradecer à **Viviana Lopes,** à **Joana Azevedo,** à **Micaela Vale,** à **Cristiana Moreira** e à **Ana Regueiras** pela disponibilidade prestada no esclarecimento de dúvidas no decorrer do trabalho laboratorial, simpatia, amizade e partilha de conhecimento dentro das respectivas especialidades de formação.

O meu sincero reconhecimento ao **Miguel** pela paciência, tranquilidade, empenho constante, dedicação e carinho nos momentos mais fáceis e nos mais difíceis. É com grande satisfação que compartilho o dia-a-dia com a pessoa mais admirável que conheço.

Agradeço aos meus **Pais** e às minhas **Irmãs**, que pelo seu esforço, educação, afecto e motivação, tornaram possível a concretização do meu dinamismo pessoal e profissional. São de facto a quem devo tudo o que sou e tenho hoje.

O meu gradecimento também à FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) pelo projecto PTDC/AMB/67075/2006, que possibilitou recursos para a realização de todas as análises laboratoriais.

Por último agradeço ao **LEGE – CIIMAR**, Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução – Centro de Investigação Marinha e Ambiental, Instituição de Acolhimento, pelo apoio e hospitalidade na realização deste trabalho.

''Prevention is better than cure…''

Resumo

As cianobactérias estão amplamente distribuídas por todo o mundo, nomeadamente em lagoas, rios e albufeiras. Alguns géneros, como *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* podem ser altamente tóxicos pela sua capacidade de produzir as cianotoxinas microcistinas e cilindrospermopsina, conhecidas como potentes hepatotoxinas. A monitorização é imprescindível para assegurar a prevenção de riscos para a saúde pública, decorrentes da utilização da água para consumo e para fins recreativos contaminada com cianotoxinas. Um aspecto importante a ter em consideração na monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas cianotoxinas é definir quais os métodos analíticos a utilizar e o volume de amostragem adequado, para minimizar discrepâncias e obter resultados fiáveis. O objectivo deste estudo foi comparar métodos moleculares, imunológicos e volumes de amostragem para uma eficaz monitorização e avaliação do potencial tóxico das cianobactérias das lagoas de Mira e Vela.

As amostras de água foram colhidas durante 5 meses nas lagoas de Mira e Vela e analisadas por métodos moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real), em relação à presença e quantidade de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes envolvidos na biossíntese de cianotoxinas, e por métodos imunológicos (ELISA) para quantificação de cianotoxinas. Foi efectuado também o isolamento de estirpes de cianobactérias de ambas as lagoas e, o seu potencial tóxico foi testado por PCR convencional, ELISA e MALDI-TOF MS.

Os métodos moleculares permitiram não só detectar, mas também quantificar cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas. Apesar de em algumas amostras com reduzida densidade celular não ter sido possível obter uma quantificação reprodutível, verificou-se que a detecção por PCR em tempo real foi mais sensível que por PCR convencional. A técnica imunológica ELISA mostrou-se rápida e sensível, permitindo a quantificação de concentrações de toxina não detectáveis por HPLC. Em amostras que se encontrem muito turvas, menores volumes de amostra permitem um maior limite de detecção/quantificação. A presença de genes *microcistina sintetase* nem sempre esteve relacionada com a concentração de toxina e esta com a densidade celular das cianobactérias. Como conclusão, o presente trabalho sugere que, apesar da técnica de PCR em tempo real permitir uma avaliação rápida e eficiente do potencial tóxico associado a cianobactérias, uma abordagem multidisciplinar parece ser a forma mais fiável de monitorizar um determinado ambiente aquático, para evitar subestimar a concentração de toxina.

Palavras-Chave – *Cylindrospermopsis*, cilindrospermopsina, ELISA, *Microcystis*, microcistina, monitorização, PCR, volume amostragem.

Abstract

Cyanobacteria are widespread throughout the world, particularly in lakes, rivers and reservoirs. Some genera such as *Microcystis* and *Cylindrospermopsis* can be highly toxic, for its ability to produce the cyanotoxins such as microcystins and cylindrospermopsin, known as potent hepatotoxins. Monitoring is essential to ensure the prevention of risks to public health due to the use of water contaminated with cyanotoxins, for drinking and recreation purposes. An important aspect to be considered in the monitoring of potentially toxic cyanobacteria and cyanotoxins is to define which methods to use and what is the more adequate volume of sample to minimize discrepancies and to obtain reliable results. The aim of this study was to compare molecular and immunological methods and the volume of sampling for an effective monitoring and evaluation of the toxic potential of cyanobacteria present in Mira and Vela lakes.

Water samples were collected during 5 months in Mira and Vela lakes and analyzed by molecular methods (conventional PCR and real time PCR) to identify and quantify toxic cyanobacteria and genes involved in biosynthesis of cyanotoxins, and immunological methods (ELISA) for quantification of cyanotoxins. It also made the isolation of strains of cyanobacteria in both lakes and their toxic potential was tested by conventional PCR, ELISA and MALDI-TOF MS.

The molecular methods allowed not only to detect but also to quantify potentially toxic cyanobacteria and genes responsible for the biosynthesis of toxins. Although in some samples with low cell density it was not possible to obtain a reproducible quantification, it was found that the detection by real-time PCR was more sensitive than for conventional PCR. The immunological technique, ELISA, proved to be rapid and sensitive, allowing to quantify of the toxin concentrations not detectable by HPLC. In samples that are very turbid, lower volumes of sample allowed us to have a higher limit of detection / quantification. The presence of *microcystin synthetase* genes was not always related to the concentration of the toxin and the last one with the cell density of cyanobacteria. In conclusion, this study suggests that although the technique of real-time PCR allows a rapid and efficient assessment of the potential associated with toxic cyanobacteria, a multidisciplinary approach seems to be the most appropriate to survey freshwater, to avoid underestimating the concentration of toxin.

Keywords - *Cylindrospermopsis*, cylindrospermopsin, ELISA, *Microcystis*, microcystin, monitoring, PCR, sample volume.

Índice

1 - Introdução 17

1.1– Principais cianobactérias e cianotoxinas 19

1.1.1– *Microcystis* e microcistina 20

1.1.2 – *Cylindrospermopsis* e cilindrospermopsina 22

1.2 – Cianobactérias (*Microcystis* e *Cylindrospermopsis*) e saúde pública 23

1.3 – Ocorrência de cianobactérias (*Microcystis* e *Cylindrospermopsis)* e suas toxinas em Portugal 25

1.4 – Locais de monitorização de cianobactérias e cianotoxinas 26

1.5 – Métodos de monitorização de cianobactérias e cianotoxinas 27

1.5.1 – Identificação microscópica 29

1.5.2 – Métodos moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real) 29

1.5.3 – Ensaio imunológico ELISA 31

1.5.4 – HPLC 32

1.5.5 – MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight - Mass Spectroscopy) 33

2 - Metodologia 34

2.1 - Locais de amostragem 34

2.2 - Amostragem e análises físico-químicas 36

2.3 – Identificação e isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas por microscopia 37

2.3.1 – Isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas 37

2.4 – Identificação genotípica e quantificação de cianobactérias e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por métodos moleculares 38

2.4.1 – Extracção de DNA 38

2.4.2 – Amplificação e identificação por PCR convencional 39

2.4.2.1 – Amplificação do gene *16S rRNA* das amostras ambientais e culturas isoladas 39

2.4.2.2 – Preparação das amostras das culturas isoladas para sequenciação molecular 40

2.4.2.3 – Amplificação de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas das amostras ambientais e das culturas isoladas.....41

2.4.3 – Amplificação, identificação e quantificação por PCR em tempo real.....44

2.5 - Quantificação de toxinas (microcistina-LR equivalente e cilindrospermopsina) por ELISA 45

2.5.1 – Preparação das amostras 45

2.5.2 - Ensaio ELISA.....45

2.6 – Quantificação de toxina (microcistina) por HPLC 47

2.6.1 - Preparação das amostras 47

2.6.2 - Aplicação do método HPLC 47

2.8 – Análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) para detecção de microcistinas 48

2.9 – Tratamento dos Resultados 48

3 - Resultados.....49

3.1 - Análise físico-química 49

3.2 – Comparação de métodos de monitorização de cianobactérias e suas toxinas em amostras ambientais.....51

3.2.1– Identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional 51

3.2.2 – Identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real.....53

3.2.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente e cilindrospermosina) por ELISA 55

3.2.5 – Quantificação de toxina (microcistina) por HPLC.....56

3.3 – Optimização de volumes de amostragem para monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas 57

3.3.1– Identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional 57

3.3.2 – Identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR em tempo real.....60

3.3.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente e cilindrospermosina) por ELISA 62

3.4 – Cianobactérias isoladas nas lagoas de Mira e Vela e seu potencial tóxico 62

3.4.1 – Identificação por microscopia e sequenciação molecular das culturas isoladas.....62

3.4.2 – Identificação de genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional 68

3.4.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente) por ELISA 70

3.4.4 – Detecção de toxinas (microcistinas) por MALDI-TOF MS.....70

4 - Discussão dos Resultados.....72

4.1 – Análise físico-química 72

4.2 – Comparação de métodos de monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas em amostras ambientais.....74

4.3 – Optimização de volumes de amostragem para monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas 82

4.4 – Cianobactérias isoladas nas lagoas de Mira e Vela e seu potencial tóxico 85

5 – Conclusão.....90

6 – Bibliografia.....92

7 – Anexos.....99

Índice de Figuras

Figura nº 1 – Estrutura química geral das microcistinas. (Tillett *et al.* 2000) 21

Figura nº 2 – Estrutura química de cilindrospermopsina. (Vasconcelos 2001) 22

Figura nº 3 – Locais de amostragem.....34

Figura nº 4 – Ponto de amostragem na lagoa da Vela 35

Figura nº 5 – Ponto de amostragem na lagoa de Mira 36

Figura nº 6 – Resultados da análise de oxigénio dissolvido e temperatura nas amostras da lagoa de Mira. SL – Sem leitura. 49

Figura nº 7 – Resultados da análise do pH e condutividade das amostras da lagoa de Mira. 50

Figura nº 8- Resultados da análise de oxigénio dissolvido e temperatura das amostras da lagoa da Vela. SL – Sem leitura.....50

Figura nº 9 – Resultados da análise do pH e condutividade das amostras da lagoa da Vela. 51

Figura nº 10 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 780 pb. 1-Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; 13- Controlo positivo; e 14- Controlo negativo.....53

Figura nº 11 - Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas, correspondentes às amostras ambientais da lagoa de Mira.....54

Figura nº 12 - Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas, correspondentes às amostras ambientais da lagoa da Vela. * -Detectado mas não quantificado. 54

Figura nº 13 – Quantificação da concentração de microcistina-LR equivalente por ELISA em amostras ambientais e tratadas das lagoas de Mira e Vela. 55

Figura nº 14– Quantificação do DNA presente nas amostras dos volumes a analisar após extracção do mesmo.....57

Figura nº 15 – Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 59

Figura nº 16 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene específico *rpoC1* de *Cylindrospermopsis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 300 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 59

Figura nº 17– Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas, correspondentes às amostras dos volumes da lagoa de Mira. * -Detectado mas não quantificado. 60

Figura nº 18– Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas, correspondentes às amostras dos volumes da lagoa da Vela. * – Detectado mas não quantificado. 61

Figura nº 19 - Géneros de cianobactérias identificados, isolados e sequenciados molecularmente, provenientes das amostras colhidas na lagoa de Mira. (1) *Pseudoanabaena*; (2 e 3) *Leptolyngbya*; (4) *Limnothrix.* 63

Figura nº 20 – Espécies/Géneros identificados, isolados e sequenciados molecularmente, provenientes das amostras colhidas na lagoa da Vela. (1) *Aphanizomenon aphanizomenoides*; (2) *Geitlerinema*; (3) *Cylindrospermopsis raciborskii*; (4) *Leptolyngbya*. 66

Figura nº 21 – Espectro de massa de MALDI-TOF MS para a espécie *Leptolyngbya frígida* isolada na amostra de 24-Set da lagoa de Mira. 71

Figura nº 22 – Quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real nas amostras da lagoa da Vela, com indicação dos valores limite propostos por algumas instituições/autores. 80

Figura nº 23 - Quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real nas amostras da lagoa de Mira, com indicação do valor limite proposto pela OMS. .81

Figura nº 24 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1 – V 26-Jun; 2 - Mi 26-Jun; 3 – V 30-Jul; 4- Mi 30-Jul; 5 – V 13-Ago; 6- Mi 13-Ago; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago e 7-Controlo negativo. 99

Figura nº 25 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1- V 27-Ago; 22 – Mi 27-Ago; 3 – V 24-Set; 4 – Mi 24-Set; 5-Controlo positivo e 6-Controlo negativo. 99

Figura nº 26 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1 – Mi 22-Out; 2 - V 22 – Out; 3 – Controlo positivo e 4-Controlo negativo. 99

Figura nº 27 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 300 pb. 1- V 26-Jun; 2- V 30-Jul; 3- V 13-Ago; 4- V 27-Ago; 5- V 24-Set; 6- V 22-Out; 7-Controlo positivo e 8- Controlo negativo. 100

Figura nº 28 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1-Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; 13-Controlo positivo e 14-Controlo negativo. 100

Figura nº 29 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers* Hep na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1-Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; e 13-Controlo positivo.....100

Figura nº 30 – Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico para *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às

amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 101

Figura nº 31 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 297 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 101

Figura nº 32 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 102

Figura nº 33 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers Hep* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo. 102

Figura nº 34 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas na Lagoa de Mira. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1-11 – Mi culturas isoladas; 12 – Controlo positivo; 13 – Controlo negativo. 102

Figura nº 35 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas na Lagoa da Vela. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1- 13 e 16-19 – V culturas isoladas; 14 e 20 – Controlo positivo; 15 e 21 – Controlo negativo. 103

Figura nº 36 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 297 pb. 1-4 - Culturas isoladas da Lagoa de Mira cujo resultado para o gene *mcyA* foi positivo; 5-7 e 10-13 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para o gene *mcyA* foi positivo;8 e 14- Controlo positivo; 9 e 15- Controlo negativo.....103

Figura nº 37 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1 -4 -Culturas isoladas da Lagoa de Mira cujo resultado para o gene *mcyE* foi positivo; 5,8-13 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para o gene *mcyE* foi positivo; 4 e 14- Controlo positivo; 7 e 15- Controlo negativo.....104

Figura nº 38 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers Hep* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1 - Cultura isolada da Lagoa de Mira cujo resultado para os *primers Hep* foi positivo; 2 e 5 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para os *primers Hep* foi positivo; 3 e 6 – Controlo positivo; 4 e 7- Controlo negativo. 104

Figura nº 39 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA*.....105

Figura nº 40 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA*. 105

Figura nº 41 – Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis*.....106

Figura nº 42 – Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis*. 106

Figura nº 43 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*.....107

Figura nº 44 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*.....107

Figura nº 45 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *mcyA*. 108

Figura nº 46 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *mcyA*. 108

Figura nº 47 – A - Cromatograma da análise por HPLC da amostra ambiental V 30-Jul com um pequeno pico que corresponde ao tempo de retenção de microcistina-LR. B - Espectro de absorvância sem nenhum pico a 238 nm, que leva a concluir que não se trata de microcistina-LR. 117

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Quantidades de cada componente utilizado para a reacção de PCR. 40

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados. 43

Tabela 3 – Resultados da amplificação por PCR convencional de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas amostras ambientais. 52

Tabela 4 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nos volumes amostrados. 58

Tabela 5 – Géneros de cianobactérias identificadas ao microscópio óptico provenientes das amostras da lagoa de Mira. 63

Tabela 6 – Resultados da sequenciação molecular do gene *16S rRNA* relativos às culturas isoladas das amostras colhidas na lagoa de Mira. 64

Tabela 7 – Géneros/espécie de cianobactérias identificadas ao microscópio óptico provenientes das amostras da lagoa da Vela. 65

Tabela 8 - Resultados da sequenciação molecular do gene *16S rRNA* relativos às culturas isoladas das amostras colhidas na lagoa da Vela. 67

Tabela 9 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas culturas isoladas na lagoa de Mira. 68

Tabela 10 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas culturas isoladas nas amostras da lagoa da Vela. .69

Abreviaturas

Adda – 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico.

Ala – Alanina.

BSA - Bovine serum albumin.

CE – Eletroforese Capilar.

Ct - Cycle threshold.

D-Glu – γ-ácido glutâmico.

DL_{50} – Dose letal mediana.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

GSH – Glutationa.

ha – Hectares.

HPLC - DAD – High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector.

MeAsp – D-eritro-β-metil ácido aspártico.

MALDI-TOF MS – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight - Mass Spectroscopy.

mcy – *Microcistina sintetase*.

Mdha – N-metildehidroalanina.

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro.

MS – Espectrometria de Massa.

N_2 – Azoto.

NH_4^+ - Amoniaco.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

PCR – Polymerase Chain Reaction.

Primers – Oligonucleótidos.

PSP - Paralytic Shellfish Poison.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

RNA – Ácido ribonucleico.

UV – Ultra-Violeta.

WFD – Water Framework Directive.

1 - Introdução

Com o aumento populacional e consequentemente a eutrofização antropogénica, aliada ao aquecimento global, tem-se verificado um agravamento da ocorrência e intensidade de florescências de cianobactérias (Vasconcelos 2006), que podem ser definidas como um rápido aumento do número de células numa determinada altura e num determinado local. Este acontecimento pode degradar a qualidade da água de várias formas. Apesar da importância das cianobactérias ao nível do ecossistema, quando estas se encontram em grandes quantidades, potenciam consequências negativas, tais como anoxia, alteração das características organolépticas da água e a contaminação da mesma com toxinas (Ouahid 2008; Vasconcelos 1995).

Os blooms tóxicos de cianobactérias são comummente encontrados, em rios, albufeiras e lagoas de água doce Portugueses (Vasconcelos 2006). Este facto representa perigo para a saúde humana e ambiental, uma vez que as toxinas produzidas pelas cianobactérias causam efeitos adversos em vários órgãos, nomeadamente o fígado (Wiedner *et al.* 2008). *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* são géneros cuja distribuição é generalizada em lagoas, rios e albufeiras de água doce Portugueses (Saker *et al.* 2003; Vasconcelos 2006), cuja água é utilizada para consumo humano ou para fins recreativos, representando portanto, um risco elevado para a saúde pública pela potencial presença de microcistinas e cilindrospermopsina. As lagoas da Vela e Mira fazem parte de um conjunto de pequenas lagoas da região centro-litoral entre Aveiro e a Figueira da Foz. Estas lagoas são utilizadas essencialmente para lazer, nomeadamente para natação, desportos náuticos sem motor e para pesca desportiva, durante a Primavera e Verão (Vasconcelos *et al.* 1993). As lagoas da Vela (Abrantes *et al.* 2006) e Mira (Vasconcelos *et al.* 1993) caracterizam-se pela ocorrência frequente de blooms de cianobactérias. As florescências tendem a acumular-se nas margens, estando acessíveis ao contacto humano quando essa água é utilizada para fins recreativos (Lindner *et al.* 2004; Vasconcelos 1993). Quando as cianobactérias morrem ou as suas células entram em ruptura podem ser libertadas para a água elevadas quantidades de toxinas. Além disso as toxinas podem ser acumuladas nos organismos aquáticos em concentrações que, apesar de não ser tóxicas para eles, estão acima dos níveis recomendados para o consumo de água potável (1µg/L) (Lindner *et al.* 2004).

Apesar de se saber que águas ricas em nutrientes, estagnadas, com temperaturas entre 15 e 30ºC e pH entre 6 e 9 são condições favoráveis à ocorrência de blooms de cianobactérias (Ouahid 2008), estes são imprevisíveis em termos temporais e espaciais.

Torna-se, assim, necessário estabelecer planos de monitorização de cianobactérias e cianotoxinas para assegurar uma vigilância e controlo das massas de água de forma rotineira e eficiente. Não existe um método simples que distinga cianobactérias tóxicas das não tóxicas. A imprevisibilidade da produção de toxinas por qualquer bloom conduz sempre a um perigo potencial. A inexistência de uma metodologia de detecção e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas cianotoxinas, estabelecida e validada pode conduzir à obtenção de resultados pouco reprodutíveis. Além disso diferentes métodos de amostragem podem produzir diferentes resultados em termos de monitorização de cianobactérias na água. Um aspecto importante dos métodos de amostragem é determinar qual o volume adequado para obter resultados fiáveis pelas metodologias de monitorização existentes. É, portanto, fundamental a optimização do volume de amostra a colher, tendo em conta a sua representatividade, com vista à monitorização de cianobactérias, das suas toxinas, e/ou genes envolvidos na biossíntese das toxinas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o estabelecimento de planos de monitorização de cianotoxinas nas massas de água. Em Portugal a monitorização da cianotoxina microcistina-LR é obrigatória pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto.

Consideráveis avanços têm sido alcançados no desenvolvimento de metodologias analíticas de detecção e análise de toxinas de cianobactérias, no entanto, a metodologia utilizada é por vezes complexa, demorada e dispendiosa (Fergusson and Saint 2003). Os métodos moleculares, PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional e PCR em tempo real parecem ser técnicas rápidas e fiáveis para avaliar o potencial tóxico dos blooms de cianobactérias (Fergusson and Saint 2003). No entanto, os métodos imunológicos, tais como ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), também são amplamente utilizados pela sua sensibilidade e rapidez, para a análise da concentração de toxinas. São escassos os estudos que comparem a eficácia das técnicas moleculares e das técnicas imunológicas para monitorizar cianobactérias e cianotoxinas.

Os objectivos deste estudo são:

- Comparar métodos de detecção e quantificação (moleculares e imunológicos) de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas cianotoxinas;
- Comparar diferentes volumes de amostragem para optimização do volume mais representativo;
- Avaliar o potencial tóxico das cianobactérias isoladas nas lagoas monitorizadas.

1.1– Principais cianobactérias e cianotoxinas

O nome de cianobactérias advém do facto destes organismos possuírem nas suas membranas fotossintéticas clorofila-a, ficocianina e aloficocianina que são pigmentos fotossintéticos acessórios que lhes conferem o tom azulado (Frazão 2008). Geralmente, as cianobactérias são mais abundantes em ambientes de água doce, pois estão normalmente associadas à intensa luz solar, às temperaturas elevadas da água e à concentração de nutrientes inorgânicos (Frazão 2008). As albufeiras e lagoas de água doce utilizadas para consumo humano ou para fins recreativos estão, portanto, sujeitas à contaminação por cianobactérias, o que tem particular importância em termos de saúde pública e ambiental, porque estes microrganismos são produtores de uma grande gama de substâncias tóxicas e bioactivas que podem afectar os humanos e animais (Wiedner *et al.* 2008).

As cianobactérias mais comuns na água doce são *Microcystis spp.*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix rubescens*, *Synechococcus spp.*, *Planktothrix agardhii*, *Gloeotrichia spp.*, *Anabaena spp.*, *Lyngbya spp.*, *Aphanizomenon spp.*, *Nostoc spp.*, *Oscillatoria spp.*, *Schizothrix spp.* e *Synechocystis spp.* (WHO 2003). *Microcystis* tem uma ampla representatividade em Portugal (Vasconcelos 2001).

A perigosidade das cianobactérias está relacionada com a sua capacidade de produzir as cianotoxinas, metabolitos secundários que podem ser extremamente tóxicos. As cianotoxinas podem permanecer dentro das células (intracelulares) ou serem libertadas para a água (extracelulares) durante o crescimento da cianobactéria ou quando ocorre lise celular (Frazão 2008). As toxinas produzidas pelas cianobactérias podem ser divididas essencialmente em três tipos, de acordo com o tipo de intoxicações (efeitos) que provocam em mamíferos (Vasconcelos 2001).

Toxinas irritantes ao contacto: ainda são desconhecidas do ponto de vista químico, com a excepção da lingbiatoxina e da aplisiatoxina, produzidas por espécies marinhas, que são potentes promotores de tumores (Vasconcelos 1995). Causam irritações na pele, reacções alérgicas e gastroenterites (Vasconcelos 2001).

Neurotoxinas: diferentes tipos de neurotoxinas têm actuações diversas do ponto de vista toxicológico, ou seja, todas provocam paralisia muscular, mas por vias diferentes. A anatoxina-a, a anatoxina-a (s) e a homonanatoxina-a provocam paralisia muscular por sobreestimulação das células musculares, enquanto, a saxitoxina e a neosaxitoxina a provocam por bloqueio das transmissões entre os axónios e as células musculares (Vasconcelos 1995; Vasconcelos 2001).

Hepatotoxinas: estas toxinas têm uma acção específica sobre os hepatócitos, sendo levadas até estes pelo sistema de transporte dos sais biliares (Vasconcelos 1995). Os filamentos intermediários e os microfilamentos são polímeros proteicos responsáveis pela manutenção da forma dos hepatócitos. As hepatotoxinas levam à dissociação destes filamentos, conduzindo a uma retracção das células que se transmite às que formam os capilares, levando a uma hemorragia intrahepática (Dawson 1997). O fígado aumenta de volume com um afluxo de sangue que não consegue libertar (Vasconcelos 1995). Outro dos efeitos, talvez mais problemático em termos de saúde humana é o facto das hepatotoxinas inibirem as fosfatases proteicas serina/trionina 1 e 2A, o que as identifica como promotoras de tumores (Wei *et al*, 2008) epiteliais, hepáticos e do cólon (Vasconcelos 1995).

Com base na estrutura química as cianotoxinas podem também ser classificadas em três grupos: péptideos cíclicos (microcistina e nodularina); alcalóides (neurotoxinas e cilindrospermopsina) e lipopolissacarídeos (Msagati *et al.* 2006).

As avaliações de risco têm identificado as microcistinas, nodularinas, anatoxinas, saxitoxinas e cilindrospermopsina como perigos prioritários para a saúde humana e animal. Contudo, a maior e mais estudada classe de toxinas de cianobactérias é representada pelas hepatotoxinas. São conhecidos cerca de 90 péptidos cíclicos relacionados, aqueles que são constituídos por sete aminoácidos são designados de microcistinas, os que são constituídos por cinco aminoácidos designam-se de nodularinas (Lindner *et al.* 2004). *Microcystis* (Vasconcelos 1994; Vasconcelos 1999; Vasconcelos *et al.* 1993) e *Cylindrospermopsis* (Saker *et al.* 2003; Valério *et al.* 2005) têm sido amplamente estudadas em Portugal, devido à sua ocorrência frequente.

1.1.1– *Microcystis* e microcistina

Microcystis é a cianobactéria mais conhecida e difundida por todo o mundo. Pertence à ordem *Chroococcales* e apresenta-se sob a forma colonial (Komarek and Anagnostidis 1998). A espécie mais importante do género *Microcystis* é a *Microcystis aeruginosa*, pela sua elevada capacidade de produzir microcistina (Dawson 1997). As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos produzidos por espécies não só do género *Microcystis*, mas também *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* (Vasconcelos 1995), *Planktothrix* (Saker *et al.* 2007a)*, Anabaenopsis* e *Hapalosiphon* (Msagati *et al.* 2006). *Microcystis* pode produzir até 8 toxinas diferentes (Vasconcelos 1995). Dependendo do genótipo de *Microcystis,* nem todas as estirpes são tóxicas, no entanto, quando presentes em blooms coexistem com as estirpes tóxicas (WHO 2003). Amostras de blooms de *Microcystis* colhidas em

diferentes locais podem mostrar grande divergência em termos do conteúdo de microcistina (Saker *et al.* 2005b). Foram já notificadas em todo o mundo mais de 60 formas químicas de microcistina produzidas principalmente por *Microcystis*, que diferem em termos de toxicidade. A maioria das variantes estruturais de microcistina é formada por desmetilação ou substituição de aminoácidos (Saker *et al.* 2005b). Microcistina-LR é a toxina mais comum em todo o mundo e foi a primeira que foi quimicamente identificada (Martins *et al.* 2009; Msagati *et al.* 2006). É também a toxina dominante nas cianobactérias isoladas em águas Portuguesas (Vasconcelos *et al.* 1995). A estrutura química das microcistinas é ciclo-(D-Ala^1-X^2-D-MeAsp^3-Z^4-Adda^5-D-Glu^6-Mdha^7) (figura 1) que pode variar nos aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições X e Z (Msagati *et al.* 2006). O aminoácido Adda, na posição 5, é responsável pela actividade biológica das microcistinas, nomeadamente os efeitos hepatotóxicos (Lindner *et al.* 2004).

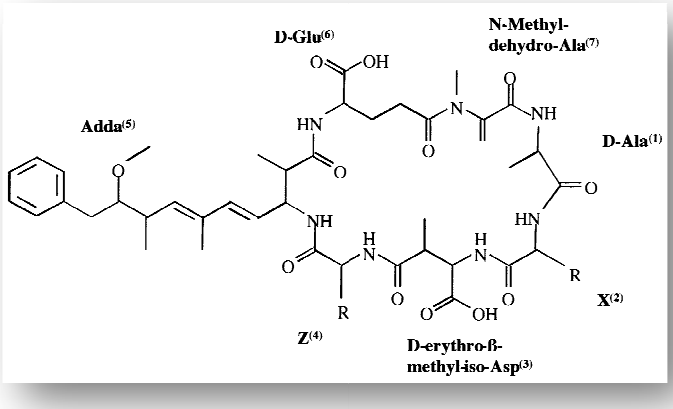


Figura nº 1 – Estrutura química geral das microcistinas. (Tillett *et al.* 2000)

O orgão alvo de microcistina é o fígado (Lindner *et al*. 2004). As microcistinas são potentes inibidores de serina/trionina, proteínas fosfatases 1 e 2A, o que conduz a um aumento da fosforilação de proteínas (Ding *et al.* 2000). Esta alteração da fosforilação de proteínas resulta em efeitos directos na destruição do citoesqueleto, causando uma hemorragia hepática (Dawson 1997), e em efeitos indirectos que afectam a sinalização do crescimento celular e processos de diferenciação, conduzindo à promoção de tumores (Dawson 1997; Ding *et al.* 2000; Martins *et al.* 2009). Outros mecanismos de toxicidade de microcistina têm sido sugeridos, nomeadamente dano oxidativo e disrupção da osmoregulação (Martins *et al.* 2009). A dose letal mediana (DL_{50}) de microcistina encontra-se num intervalo de 50 a 500 µg/Kg (bioensaio com ratos via intraperitonial) (Saker *et al.* 2005b). Apesar da hepatotoxicidade aguda que as microcistinas provocam ser preocupante, a saúde humana está geralmente comprometida pela promoção de tumores, causada pela exposição crónica a estas toxinas (Dawson 1997; Lindner *et al.*

2004). Estudos realizados com murganhos aos quais foi aplicada uma substância cancerígena na pele e administrada oralmente água que continha microcistinas, demonstrou que estes animais desenvolveram tumores muito maiores do que os que consumiram água sem as toxinas (Vasconcelos 1995).

Muitas estirpes de *Microcystis* além de produzir microcistinas produzem uma variedade de outros péptidos que incluem aeruginosinas, anabaenopeptilidas, cianopeptolinas, anabaenopeptinas e microgininas. Estes compostos apresentam uma variada gama de actividades biológicas (Saker *et al.* 2005b), no entanto, os seus efeitos tóxicos ainda não são conhecidos.

1.1.2 – *Cylindrospermopsis* e cilindrospermopsina

Cylindrospermopsis raciborskii é uma cianobactéria tóxica que ocorre frequentemente em blooms. Embora *Cylindrospermopsis raciborskii* seja uma cianobactéria maioritariamente reportada em países subtropicais como Austrália e Brasil, na última década a sua distribuição tem sido abundante no hemisfério norte. O aquecimento global associado às alterações climáticas pode contribuir para o aumento da ocorrência desta espécie invasiva em países com clima temperado, como Portugal (Vasconcelos 2006). Esta espécie tem a capacidade de produzir o alcalóide hepatotóxico designado de cilindrospermopsina e a altamente tóxica PSP (paralytic shellfish poison) (Valério *et al.* 2005). A cilindrospermopsina é uma hepatotoxina produzida por diferentes cianobactérias da ordem *Nostocales* (Wiedner *et al.* 2008), incluindo os géneros de cianobactérias de água doce *Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Raphidiopsis* e *Umezakia* (Saker *et al.* 2004). Esta toxina pertence a uma nova classe de alcalóides que contém um grupo guanidina tricíclica (Griffiths and Saker 2003) ligada ao grupo hidroximetiluracil (Froscio *et al.* 2008).

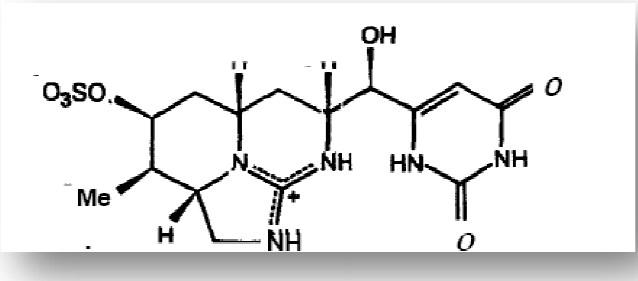


Figura nº 2 – Estrutura química de cilindrospermopsina. (Vasconcelos 2001)

Embora os mecanismos de toxicidade de cilindrospermopsina não sejam totalmente conhecidos (Froscio *et al.* 2003), esta toxina está classificada como uma citotoxina que inibe a síntese proteica (Griffiths and Saker 2003), em lisados de reticulocitos de coelho (Terao *et al.* 1994), sendo este efeito irreversível (Froscio *et al.* 2003). Estudos efectuados demonstram que a exposição de células eucarióticas de retículo endoplasmático de fígado de rato a cilindrospermopsina provoca a dissociação dos ribossomas (Froscio *et al.* 2008). A exposição à toxina produz também hepatonecrose em animais e lesões extrahepáticas com localização e severidade variáveis (Terao *et al.* 1994). Estudos histopatológicos têm demonstrado que o fígado é o principal orgão alvo (Fergusson and Saint 2003; Terao *et al.* 1994), no entanto, também foram relatados danos nos rins, timo, coração (Terao *et al.* 1994) e intestinos (Saker *et al.* 2003). Cilindrospermopsina apresenta um DL_{50} de 2,1 mg/Kg, após 24h (horas) (em ratos via intraperitonial) e 0,2 mg/Kg, após 6 dias de exposição (Saker and Eaglesham 1999). Além dos efeitos agudos, cilindrospermopsina é também considerada genotóxica (Messineo *et al.* 2009) e potencialmente cancerígena (Berry *et al.* 2009; Messineo *et al.* 2009; Rasmussen *et al.* 2007). Estudos sugerem que o potencial reactivo da guanidina pode actuar na quebra das ligações do DNA quando as células são expostas a concentrações de cilindrospermopsina numa gama de 1-10 mg/L, conduzindo a diversas anomalias celulares (Berry *et al.* 2009).

Recentes estudos têm apontado que a toxicidade aguda de cilindrospermopsina está relacionada com a sua biotransformação pelo citocromo P450 (Berry *et al.* 2009; Froscio *et al.* 2003). Microssomas hepáticos tratados com cilindrospermopsina provocam uma redução extensiva do citocromo P450 (Terao *et al.* 1994). Foi demonstrado que a inibição da actividade do citocromo P450 aumentou a taxa de sobrevivência de ratos tratados com cilindrospermopsina (Noris *et al.* 2002). Esta toxina parece estar também relacionada com a redução de glutationa (GSH). Estudos efectuados com hepatócitos de ratos expostos a cilindrospermopsina, sugerem que esta toxina inibe a síntese de GSH, reduzindo a capacidade de desintoxicação celular (Griffiths and Saker 2003).

1.2 – Cianobactérias (*Microcystis* e *Cylindrospermopsis*) e saúde pública

A constatação de que os blooms de cianobactérias podiam provocar intoxicações humanas remota ao inicio do século XX, havendo registos de alterações gastrointestinais em populações humanas nos Estados Unidos da América em 1930 (Vasconcelos 1995).

Existem casos de intoxicações letais por cianotoxinas, no entanto, não correspondem a águas de consumo directo, pois quando as cianobactérias se encontram em grandes densidades, conferem à água um odor e aspecto desagradáveis, que geralmente, afastam potenciais utilizadores.

Microcystis tem sido implicada na morte de humanos e animais, devido a intoxicações associadas à água contaminada com microcistina (Saker *et al.* 2005a). No Brasil, em Caruaru, numa clínica de hemodiálise, as soluções de diálise foram preparadas com água de um reservatório contaminada com microcistina. Este incidente provocou a morte a 43 pacientes e outros 126 desenvolveram hepatite tóxica (Dawson 1997). Existem também estudos epidemiológicos que evidenciam que há uma correlação positiva entre a incidência de cancro primário no fígado na China (Dawson 1997; Ouahid 2008) (Messineo *et al.* 2009) e na Florida (Messineo *et al.* 2009) e o consumo de água com microcistinas. As intoxicações agudas causadas por cianobactérias em humanos parecem ser raras no nosso país (Vasconcelos 1994). Em Portugal, há a referência apenas da ocorrência de um caso de intoxicação aguda humana, numa população do Alentejo, relacionada com o consumo de água do rio Guadiana que apresentava uma florescência de *Aphanizomenon flos-aquae* (Oliveira 1991). O principal sintoma apresentado foi perturbação gastrointestinal com diarreia, que desapareceu após cessar o contacto com a água contaminada. As intoxicações crónicas são mais difíceis de detectar e resultam, geralmente, da ingestão repetida de pequenas doses de toxinas de cianobactérias. As hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas) são as maiores responsáveis por intoxicações crónicas (Vasconcelos 1995). Tendo em consideração a sua toxicidade a OMS propôs uma concentração máxima admissível de microcistina-LR em água potável de 1 µg/L. Mais tarde este valor foi imposto pela legislação Portuguesa, nomeadamente o Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. O valor de 1 µg/L de microcistina-LR, admite a hipótese de que 80% da toxina é ingerida através da água. Vasconcelos (1995) verificou que a concentração de microcistinas nas estirpes, com condições ideais de crescimento no laboratório e nas amostras de florescências (meio natural) são muito próximas, o que indica que os utilizadores/consumidores de água correm o risco de contactar/consumir grandes quantidades de toxinas.

Cylindrospermopsis raciborskii tem-se tornado preocupante numa perspectiva de saúde pública, pela capacidade de produzir cilindrospermopsina, que tem sido implicada em surtos de doença humana. Em 1979 na Austrália (Palm Island) aconteceu um dos casos mais graves de intoxicação humana relacionada com o consumo de água contaminada com cilindrospermopsina (Griffiths and Saker 2003; Humpage and Falconer 2003). Mais de uma centena de crianças deu entrada no hospital com sintomas de

gastroenterite e hepatoenterite (Berry *et al.* 2009). Têm sido também reportados alguns incidentes de intoxicações humanas e morte de gado associados à presença desta toxina em albufeiras de abastecimento de água e explorações agrícolas (Saker *et al.* 2004). De acordo com bioensaios elaborados com a cilindrospermopsina, os sintomas de intoxicação são claramente distintos dos que são provocados por outras cianobactérias hepatotóxicas, tal como microcistina (Saker *et al.* 2003). Perante a inexistência de um valor de referência que assegurasse a qualidade da água, foi proposto um valor guia limite de 1 µg/L de cilindrospermopsina em água para consumo humano (Humpage and Falconer 2003).

Microcistina e cilindrospermopsina parecem ser acumuladas nos tecidos de moluscos, podendo estes ser vectores destas toxinas ao longo da cadeia alimentar. Cilindrospermopsina foi encontrada em concentrações de 4,3 µg de toxina/g de peso seco, em lagostins (Saker and Eaglesham 1999). Este valor é comparável com a acumulação de microcistina-LR nos mesmos organismos (Vasconcelos 2001).

1.3 – Ocorrência de cianobactérias (*Microcystis* e *Cylindrospermopsis)* e suas toxinas em Portugal

Em Portugal, muitas das massas de água doce que são utilizadas para abastecimento e fins recreativos apresentam blooms de *Microcystis aeruginosa* durante os meses de Verão (Saker *et al.* 2005b). Associados a estes blooms está uma variedade de formas químicas de microcistina em elevadas quantidades (Saker *et al.* 2005b). Em albufeiras de água para consumo humano situadas no Marco de Canaveses e Amarante foram isoladas estirpes de *Microcystis aeruginosa* cujo conteúdo apresentava misturas de microcistinas e outros oligopéptidos. Uma grande diversidade de microcistinas é encontrada nas águas Portuguesas, no entanto, microcistina-LR é a mais comum (Vasconcelos 2006). Estudos têm mostrado que *Microcystis* está presente em mais de 70% dos rios, lagos e albufeiras de água doce Portugueses, e em 60% das amostras onde ocorre o género, microcistina também está presente (Saker *et al.* 2007a). As lagoas de Braças, Vela e Mira, localizadas na região centro-litoral de Portugal, encontram-se em avançado estado de eutrofização, desenvolvendo florescências de *Microcystis aeruginosa* e de *Anabaena flos-aquae* durante os meses de Verão e Outono (Vasconcelos *et al.* 1993).

Muitos países da Europa já reportaram a ocorrência de cilindrospermopsina associada a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Vasconcelos 2006). Esta cianobactéria tem-se destacado, nomeadamente em países temperados como Espanha, França, Alemanha e Grécia. Em Portugal já foi reportada a ocorrência de estirpes de *Cylindrospermopsis raciborskii* em muitas albufeiras e lagoas do centro e sul do país, (Saker *et al.* 2003; Vasconcelos 2006) utilizadas para consumo e para fins recreativos. No entanto, cilindrospermopsina nunca foi detectada. Saker *et al* (2003) reportou o primeiro relato de *Cylindrospermopsis raciborskii* tóxica em Portugal, que embora não devido a cilindrospermopsina, revela a importância para que haja uma maior vigilância e controlo das massas de água utilizadas para fins recreativos.

1.4 – Locais de monitorização de cianobactérias e cianotoxinas

É do conhecimento geral que as florescências de cianobactérias acarretam grandes riscos para a saúde pública e para os ecossistemas em geral. Os blooms de cianobactérias têm imensos custos associados, tais como a redução da biodiversidade dos sistemas naturais, a morte de peixes e outra flora aquática (por desoxigenação da coluna de água), a desclassificação de locais de turismo (por proibição da utilização da água para fins recreativos), a perda de pesca, assim como custos associados a doenças em humanos (Gonçalves *et al.* 1996; Saker *et al.* 2007a). Dado o potencial de graves danos, devido à presença sistemática de cianobactérias potencialmente tóxicas nas massas de água Portuguesas, foi estabelecida a necessidade de fazer vigilância sob a forma de programas de monitorização para identificar os períodos de alto risco para os consumidores/utilizadores e, alertar os responsáveis pela gestão e manutenção da qualidade da água.

As lagoas, ecossistemas aquáticos lênticos, cuja taxa de renovação da água é relativamente baixa, têm a tendência para aumentar a sua carga em nutrientes e acumular matéria orgânica, potenciando a eutrofização (Vasconcelos 1995). A necessidade de monitorização das cianobactérias tóxicas e das suas toxinas é bem evidente em lagoas eutróficas que são utilizadas para fins recreativos (Vasconcelos 1994) onde há contacto directo com a água, especialmente durante a Primavera e Verão. Além disso as lagoas de Mira e Vela representam ecossistemas dulciaquícolas naturais de grande importância, especialmente por serem locais de nidificação e de invernia para centenas de aves aquáticas (Vasconcelos 1995). Na lagoa de Mira, Vasconcelos (1995)

obteve densidades elevadas de cianobactérias durante os meses de Verão com florescências de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*. Segundo o mesmo autor as cianobactérias parecem dominar nesta lagoa, geralmente a partir de Junho, mantendo-se com densidades elevadas até Novembro. Saker *et al* (2003) refere também a lagoa da Vela como um dos locais onde C*ylindrospermopsis raciborskii* é sazonalmente abundante como fitoplâncton.

1.5 – Métodos de monitorização de cianobactérias e cianotoxinas

A Directiva da Água - Water Framework Directive (WFD) estabelecida pela União Europeia, que é uma nova regulamentação que tem como objectivo preservar e gerir o ambiente aquático, refere que o fitoplâncton, é um indicador biológico da qualidade da água que deve ser monitorizado regularmente (Domingues *et al.* 2008). No entanto, a monitorização de fitoplâncton pode ter muitos constrangimentos, nomeadamente na escolha dos métodos a utilizar (Domingues *et al.* 2008). O elevado potencial tóxico das cianobactérias e a sua ubiquidade tornou necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis, fiáveis e reprodutíveis para avaliar a concentração de toxinas e o grau de toxicidade dos blooms. Os métodos diferem em termos de princípios de detecção, informação fornecida, equipamento e simplicidade da elaboração (Msagati *et al.* 2006; Ward *et al.* 1997). A selectividade e a sensibilidade são também importantes critérios de selecção do método a utilizar (Msagati *et al.* 2006). A monitorização da água destinada a consumo humano ou uso para fins recreativos inclui a identificação das cianobactérias potencialmente tóxicas, a determinação da sua densidade e a quantificação da concentração de cianotoxinas (Vasconcelos *et al.* 1996). Esta monitorização deve ser feita de forma rápida, simples e inequívoca.

A técnica microscópica é utilizada como metodologia de monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas, permitindo a sua identificação e quantificação. Apesar das lacunas no fornecimento de informações fiáveis sobre a morfologia das estirpes com capacidade ou não de produção de toxinas, a microscopia continua a ser amplamente utilizada pela maior parte das entidades de referência que avaliam a qualidade da água, cuja presença de cianobactérias funciona como sistema de alerta (Saker *et al.* 2007a). Recentemente, o uso das técnicas moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real) para a detecção, identificação e quantificação de cianobactérias presentes em blooms e confirmação do seu potencial tóxico têm sido testados (Baker *et*

al. 2002), apresentando resultados bastante positivos em termos de monitorização de amostras ambientais.

Dois métodos são geralmente empregados na identificação e quantificação das cianotoxinas: testes bioquímicos/biológicos e testes físico-químicos (Vasconcelos 1995). Entre os métodos bioquímicos de rastreio, são utilizados para as hepatotoxinas de cianobactérias os bioensaios com ratos, os imunoensaios ELISA e os ensaios de inibição das proteínas fosfatases (Campàs *et al.* 2005; Griffiths and Saker 2003). Os bioensaios com ratos fornecem apenas uma informação qualitativa. Geralmente são utilizados para determinar a toxicidade dos blooms, permitindo determinar também a classe das toxinas (Msagati *et al.* 2006). Contudo, este tipo de ensaio não possui sensibilidade nem especificidade suficientes para a análise de amostras ambientais (Msagati *et al.* 2006), conduzindo à utilização de métodos alternativos (Pearson and Neilan 2008). ELISA, apesar de mostrar reactividade cruzada variável, parece ser eficaz para a determinação do conteúdo de microcistina, nodularina e cilindrospermopsina em amostras ambientais (Msagati *et al.* 2006). O teste de inibição das proteínas fosfatases baseia-se no mecanismo de acção das microcistinas e nodularina, que inibem as proteínas fosfatases 1 e 2A. A reacção de inibição destas proteínas é utilizada como uma medida de concentração da toxina (Msagati *et al.* 2006). Este ensaio tem como principal desvantagem o facto de não ser exequível para toxinas com um mecanismo de acção diferente, como por exemplo cilindrospermopsina.

Os métodos físico-químicos utilizam propriedades das cianotoxinas que permitem a sua detecção e quantificação (Msagati *et al.* 2006). Entre os métodos mais utilizados está o HPLC (High Performance Liquid Chromatography), a electroforese capilar (CE), a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massa (MS) (Msagati *et al.* 2006). Na legislação Portuguesa está estabelecida a pesquisa de microcistina-LR, contudo, não é referido qual o método de análise. Na maioria dos laboratórios microcistina-LR é analisada por HPLC (Lindner *et al.* 2004), método recomendado pela OMS.

Uma descrição mais detalhada dos métodos, que pelas suas características são referenciados como mais adequados para identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas cianotoxinas, em amostras ambientais, é apresentada a seguir.

1.5.1 – Identificação microscópica

A identificação de géneros de cianobactérias pode ser efectuada pelo seu cariz morfológico por microscopia (Baker *et al.* 2002). O princípio do método de identificação inclui o uso de características observáveis ao microscópio óptico, tais como a forma da colónia, a presença de baínha extracelular, a diferenciação e arranjo das células, a cor da colónia, o conteúdo celular e as dimensões das células e filamentos (Vasconcelos 1995). Algumas cianobactérias possuem células especializadas, os heterocistos e os acinetos, que só a elas estão associadas, tendo portanto, uma importância significativa em termos de identificação. Os heterocistos distinguem-se das células vegetativas pelos seus protoplastos hialinos, sem grânulos de materiais de reserva ou vacúolos gasosos. Possuem também uma parede espessa e a sua principal função é fixar azoto atmosférico, criando-se dentro do heterocisto um ambiente livre de oxigénio, no qual o azoto é fixado, uma vez que a enzima que cataliza a redução de N_2 a NH_4^+, a nitrogenase, é inactivada na presença de oxigénio (Van den Hoek *et al.* 1995).

A identificação de cianobactérias por microscopia está sujeita a um elevado nível de erro (Rasmussen *et al.* 2007). Diferentes estirpes da mesma espécie podem ser morfologicamente semelhantes e, no entanto, diferir em termos de toxicidade (Baker *et al.* 2002). Muitas das características morfológicas utilizáveis na distinção de géneros ou espécies de cianobactérias podem variar, num mesmo clone, ao longo do tempo. Tal sucede em amostras de cianobactérias coloniais como *Microcystis sp.*. Estirpes de espécies de *Microcystis aeruginosa* morfologicamente idênticas podem produzir ou não toxinas (Saker *et al.* 2007a).

1.5.2 – Métodos moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real)

Os métodos de biologia molecular resolveram muitos dos problemas relacionados com a classificação morfológica e taxonómica das cianobactérias. Estes métodos parecem ser uma ferramenta muito útil e sensível (Saker *et al.* 2007a), pois permitem a detecção de um reduzido número de células (Baker *et al.* 2002). Além disso, são rápidos e específicos. A sua especificidade está relacionada com capacidade de detectar cianobactérias em amostras com muitas outras espécies de fitoplâncton (Baker *et al.* 2002).

As vias de produção das principais cianotoxinas têm sido elucidadas. A identificação dos genes responsáveis pela biossíntese de microcistinas por *Microcystis*

abriu a possibilidade de aplicar programas de monitorização com métodos moleculares (Saker *et al.* 2007a). Vários estudos têm demonstrado a relação entre genes *microcistina sintetase (mcy)* e a presença de microcistina em células de cianobactérias (Saker *et al.* 2005a; Saker *et al.* 2007a), pois as que contêm esses genes são descritas como muito prováveis produtoras da toxina (Saker *et al.* 2007b).

Baker *et al* (2002) em estudos que efectuou para testar as técnicas moleculares como um dos métodos de monitorização de blooms de cianobactérias tóxicas, comparando com bioensaios com ratos, microscopia e HPLC, concluiu que o PCR convencional foi o método mais eficaz, indicando que este, pode ser utilizado para melhorar a gestão da qualidade da água. Saker *et al* (2007a) desenvolveu também estudos para testar a eficácia das técnicas moleculares na detecção de cianobactérias tóxicas em amostras ambientais e obteve uma boa concordância entre os resultados obtidos por técnicas moleculares, observação microscópica e métodos químicos. As técnicas moleculares parecem ter um valor óbvio na monitorização de cianobactérias nas massas de água. Claramente a técnica de PCR convencional é limitada pela ausência de informações quantitativas.

A adaptação do PCR convencional para um método quantitativo, o PCR em tempo real, possibilita além da identificação a quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas (Pearson and Neilan 2008). O PCR em tempo real é um avanço poderoso em relação ao PCR convencional. O PCR em tempo real tem sido utilizado para quantificar a abundância de cianobactérias e de genes implicados na biossíntese de cianotoxinas, nomeadamente *Microcystis* e genes *mcy,* em amostras ambientais (Saker *et al.* 2005b). Esta técnica parece ser uma importante ferramenta em termos de monitorização de cianobactérias, pois estas parecem ser problemáticas quando atingem altas densidades celulares (Rasmussen *et al.* 2007). O uso do PCR em tempo real agiliza a análise de amostras de água com blooms de cianobactérias, reduzindo o tempo e trabalho necessário na análise e quantificação microscópica (Rinta-Kanto *et al.* 2005). O princípio do método baseia-se na utilização de corantes de fluorescência que são combinados com a amplificação e detecção das fases da reacção de PCR. A análise pressupõe medir o aumento do sinal de fluorescência que é proporcional à quantidade de DNA produzido durante cada ciclo de PCR. É definido um limiar de fluorescência, o Ct (Cycle threshold), e o número de ciclos de PCR em que a fluorescência passa o limiar estabelecido, permite determinar a quantidade de DNA (Kurmayer and Kutzenberger 2003). É construída uma curva standard com um número de células pré-determinadas, que relaciona a concentração de DNA em células equivalentes com os valores de Ct. A correlação entre a fluorescência e a quantidade de produto amplificado permite uma exacta quantificação das moléculas-alvo (Nolan *et al.* 2006). A

temperatura de *Melting* de cada produto é definida como a temperatura que corresponde ao pico máximo que ocorre na reacção. A análise dos resultados através de softwares inclui a exibição da curva de amplificação, a curva *Melt* para a informação da temperatura de *Melting*, e a curva padrão baseada nos valores de Ct.

1.5.3 – Ensaio imunológico ELISA

Os métodos bioquímicos, nomeadamente os imunoensaios ELISA, são um grande desafio como métodos de rastreio de cianotoxinas. São menos específicos que os métodos físico-químicos, mas são mais sensíveis do que estes. Além disso são rápidos, sendo particularmente úteis para a análise de amostras ambientais (Lindner *et al.* 2004). Os ensaios ELISA que usam anticorpos monoclonais ou policlonais apresentam alta especificidade e sensibilidade (Rapala *et al.* 2002), no entanto, não fornecem informações sobre a toxicidade das microcistinas nem sobre a cianobactéria produtora (Pearson and Neilan 2008). Autores referem que os anticorpos contra microcistina-LR utilizados no teste reagem cruzadamente com uma variedade de microcistinas (Vasconcelos 1995), influenciando a sua sensibilidade e reprodutibilidade (Ibelings and Chorus 2007; Ouahid 2008). Parece haver melhores resultados usando anticorpos monoclonais, por modificação da reactividade cruzada (Rivasseau *et al.* 1999). Contudo, parece ser mais vantajoso o uso de anticorpos policlonais, pois a sua produção é muito mais rápida e simples do que os anticorpos monoclonais (Metcalf *et al.* 1999). Em estudos efectuados por Metcalf *et al* (1999) em que utilizou anticorpos policlonais, todos reagiram bem com todas as variantes de microcistinas e nodularina.

ELISA é um teste com potencial para detecção de microcistinas bastante abaixo do valor limite estabelecido pela OMS e pela legislação em vigor (1μg/L), através de um procedimento simples, e sem precisar de concentrar previamente a amostra (Metcalf *et al.* 1999). Rivasseau *et al.* (1999) avaliou o Kit ELISA para microcistinas pela sua reprodutibilidade, precisão e limites de detecção em amostras ambientais, comparando os resultados obtidos com cromatografia líquida. O teste mostrou ser capaz de medir microcistina-LR equivalente em amostras de água ambientais, de uma forma rápida e sem qualquer tratamento prévio (Rivasseau *et al.* 1999). Num teste ELISA para microcistina a gama de padrões varia entre 0,1 e 1,6 μg/L, permitindo que seja possível uma monitorização adequada, sem qualquer tratamento prévio da amostra (Rapala *et al.* 2002; Rivasseau *et al.* 1999). Contudo, autores referem que as amostras devem ser tratadas antes de se efectuar o teste, com o objectivo de lisar as células e permitir que os

compostos intracelulares fiquem em solução, recuperando assim as toxinas hidrossolúveis (Vasconcelos and Pereira 2001).

Dependendo da reactividade cruzada do anticorpo que se utilize, o resultado de ELISA será uma estimativa global ou parcial do conteúdo de microcistinas (Ouahid 2008). Os anticorpos reagem especificamente com o aminoácido Adda e seus derivados, reconhecendo, em princípio todas as microcistinas (Ouahid 2008). O facto de existirem aproximadamente 60 variantes de microcistina, pode ser uma condicionante deste tipo de ensaio. As variantes de microcistina têm distintos graus de toxicidade, por isso a concentração total de microcistinas é expressa em microcistina-LR equivalente (Ouahid 2008). Esta característica faz diminuir a especificidade do teste. Por esta razão ELISA deve ser complementada com outros métodos analíticos para saber qual a composição de microcistinas.

1.5.4 – HPLC

É o método usualmente utilizado para a análise de microcistinas, porque permite a sua identificação e quantificação (Msagati *et al.* 2006; Rapala *et al.* 2002). Nesta técnica, a identificação das microcistinas é dada por dois critérios, o tempo de retenção e o espectro de absorção em UV (ultravioleta) (Ouahid 2008). Para se poder registar o espectro de microcistinas, é necessário um espectrofotómetro com um dispositivo de díodos (DAD), que permite o registo dos espectros quase de forma instantânea (Ibelings and Chorus 2007; Ouahid 2008). A detecção da toxina microcistina é feita por espectrofotometria a 238 nm. A cromatografia líquida é selectiva e permite a detecção de diferentes variantes de microcistina. De uma forma geral, os programas de quantificação de microcistinas em água doce podem fazer-se utilizando HPLC com microcistina-LR como padrão. Além desta toxina existem disponíveis no mercado microcistina-YR e microcistina-RR, que também podem ser usadas como padrões (Vasconcelos 1995).

Uma das desvantagens deste método é que requer um procedimento de limpeza e extracção das amostras para que possa ser utilizado, o que torna o processo longo e trabalhoso. Há a necessidade de pré-purificar ou concentrar a amostra antes da sua injecção no sistema, especialmente no caso de amostras de água. Os solventes a usar no sistema de HPLC variam consoante o autor, mas são essencialmente combinações de acetonitrilo ou metanol em acetato de amónio ou sulfato de sódio (Vasconcelos 1995). Outra das desvantagens associadas a este método é que tem um limite de detecção 1000 vezes inferior ao de ELISA (Rivasseau *et al.* 1999). Trata-se, portanto, de um método menos sensível, mas que no entanto, é bastante específico e selectivo. Além

disso este método é bastante dispendioso, requer profissionais especializados (Rapala *et al.* 2002) e embora permita uma medição inequívoca do risco associado ao consumo de água, não identifica nem quantifica as cianobactérias responsáveis pela produção das toxinas (Rasmussen *et al.* 2007).

1.5.5 – MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight - Mass Spectroscopy)

A espectrometria de massa inclui um conjunto de técnicas amplamente utilizadas para a determinação de analítos orgânicos e inorgânicos através da geração de iões a partir de átomos ou moléculas (Ouahid 2008). Quando uma informação adicional é necessária e a identificação das cianotoxinas é requerida, um método mais avançado e sofisticado pode ser utilizado (Msagati *et al.* 2006). Este método permite a separação e identificação simultânea de várias toxinas numa mistura (Msagati *et al.* 2006). O processo inclui três fases: ionização, separação e detecção dos iões originados. Dependendo dos objectivos e das classes de moléculas a analisar utiliza-se combinações de ionização e separação dos iões formados (Ouahid 2008). MALDI-TOF MS é o mais adequado para a identificação das microcistinas (Ouahid 2008). MALDI-TOF MS significa espectrometria de massa com base na dessorção e ionização das proteínas com laser, associado com uma matriz (MALDI) que analisa a massa através do tempo de dispersão dos iões no tubo de análise (TOF). Iões produzidos na fonte de ionização são separados no analisador de massa em função da razão massa/carga (m/z). Os dados são registados como um espectro (intensidade *vs* m/z).

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido amplamente utilizada para demonstrar a variedade de moleculas que são produzidas pelas cianobactérias, nomeadamente *Microcystis* (Saker *et al.* 2005b). Esta técnica, que geralmente é aplicada a culturas isoladas, tem sido utilizada para fornecer informações úteis sobre os péptidos potencialmente tóxicos que podem ocorrer em lagos e reservatórios de água doce (Saker *et al.* 2005b). A detecção de cianotoxinas por MALDI-TOF MS é muito atractiva pois é um método que requer pouca biomassa e que não necessita de uma purificação prévia para identificar as várias cianotoxinas (Pearson and Neilan 2008; Welker *et al.* 2006). No entanto, o equipamento é bastante dispendioso e portanto não está ao alcance de todos os laboratórios (Pearson and Neilan 2008). MALDI-TOF MS permite a determinação de cianotoxinas com um limite de detecção de aproximadamente 0,02 µg/L (Msagati *et al.* 2006).

2 - Metodologia

2.1 - Locais de amostragem

A amostragem foi efectuada nas lagoas da Vela e Mira (figura nº 3). Estas lagoas são importantes áreas, onde a água é utilizada para fins recreativos, pesca desportiva e produção agrícola. Ambas as lagoas recebem efluentes de esgotos provenientes de pequenas comunidades e das áreas agrícolas circundantes. Os locais foram escolhidos de acordo com o seu potencial de eutrofização e consequente desenvolvimento de florescências, histórico em possuir espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas e pela possibilidade desta água constituir risco para a saúde pública na decorrência da sua utilização.

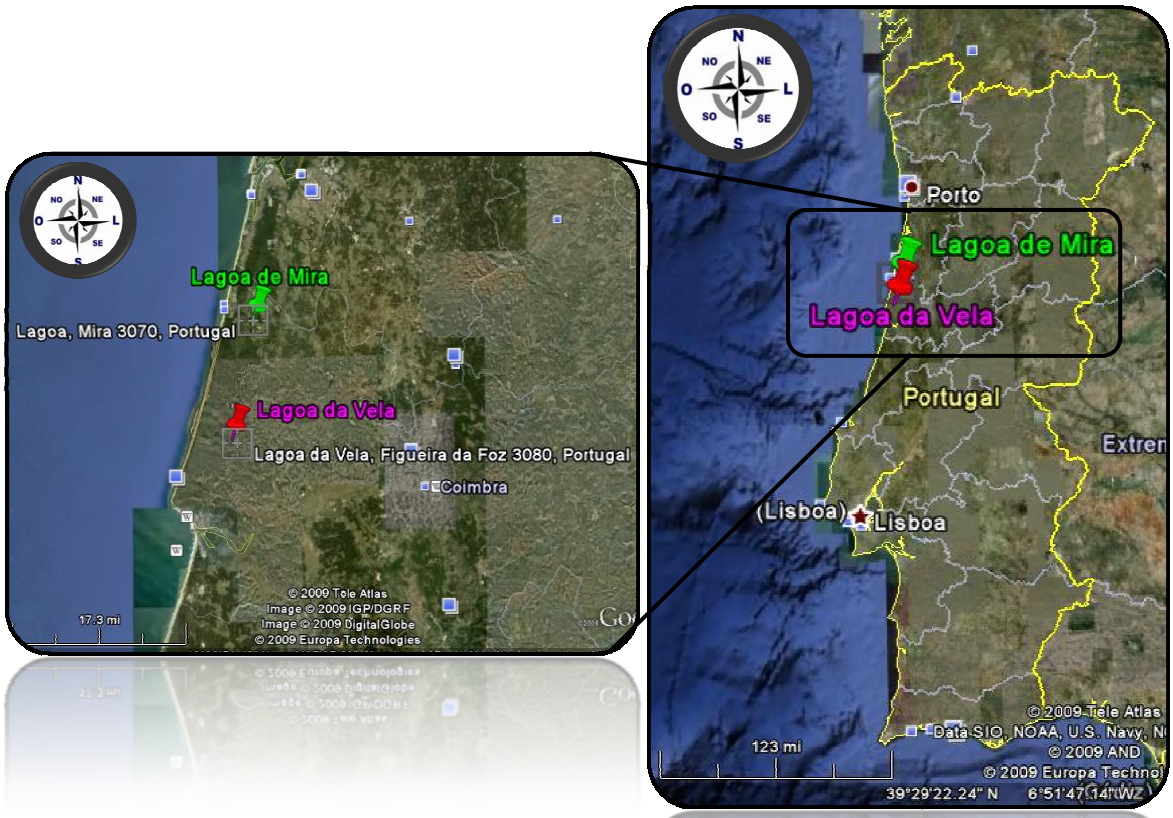


Figura nº 3 – Locais de amostragem.

A lagoa da Vela situa-se no centro-litoral de Portugal (40º16'N; 8º47'W). É um lago eutrófico temperado. Caracteriza-se por uma água permanentemente turva, com uma profundidade média e máxima de 0,9 e 2,4 metros, respectivamente. Tem cerca de 70 ha de superfície e um volume total de 70x104 m^3 (Abrantes *et al*, 2006). Do lado Este da

lagoa existem campos agrícolas e algumas habitações, do lado Oeste existe uma mata de pinheiros (*Pinus pinaster*) e acacias (*Acacia spp.*) separada da lagoa por uma estrada. A lagoa é alvo de lixiviados por parte dos campos agrícolas circundantes e de pequenos esgotos clandestinos de águas residuais. Os blooms de algas são frequentemente observados, nomeadamente nas estações mais quentes do ano (Abrantes *et al*, 2006). O ponto de amostragem (figura nº 4) foi seleccionado de acordo com a sua potencialidade em possuir cianobactérias, tendo em conta os parâmetros ambientais que propiciam o seu desenvolvimento e localização.



Figura nº 4 – Ponto de amostragem na lagoa da Vela

A lagoa de Mira situa-se de igual forma no centro-litoral de Portugal (40º26'N; 8º45'W). É também um lago eutrófico e tem uma dimensão de cerca de 21 ha. Apresenta um enquadramento predominantemente agrícola, no entanto, uma parte do lado Norte-Oeste confina um empreendimento turístico privado. Esta lagoa é alimentada por dois ribeiros que correm à superfície e que têm uma elevada carga de nutrientes, resultante da lixiviação dos campos agrícolas circundantes. Além disso um dos usos de maior expressão desta massa de água é a pesca desportiva, que está relacionada com blooms de cianobactérias, promovidos pelo uso descontrolado de isco para os peixes (Gonçalves *et al.* 1996). Esta parece ser a actividade mais preocupante em termos de eutrofização de origem antropogénica. A selecção do ponto de amostragem (figura nº5) foi de acordo com a acessibilidade ao local e potencialidade em possuir cianobactérias tendo em conta os parâmetros ambientais óptimos ao seu desenvolvimento e localização.



Figura nº 5 – Ponto de amostragem na lagoa de Mira

2.2 - Amostragem e análises físico-químicas

Foram efectuadas amostragens na margem das duas lagoas referidas, mensalmente e quizenalmente (apenas no mês de Agosto), durante um período de cinco meses (Junho a Outubro de 2008).

Antes de cada colheita foram registados alguns parâmetros físico-químicos da água. A temperatura (ºC) e o oxigénio dissolvido (mg/L) foram medidos com um oxímetro (WTW OXI 320/SET). O pH e a condutividade (µS/Cm) da água foram medidos através de um leitor de pH (Multiline P3 pH/LF-SET, Germany).

Para se proceder ao isolamento das cianobactérias, colheu-se uma amostra de água (aproximadamente 100 mL) concentrada através de vários arrastos com uma rede de plâncton, com 50 µm de malha. De seguida efectuou-se a colheita de diferentes volumes de amostra de água em frascos estéreis com capacidade de 2, 15, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL, para optimização do volume mais representativo. Foram também colhidas amostras para quantificação de toxinas (microcistina e cilindrospermopsina) por ELISA (15 mL) e HPLC (1000 mL). Além disso colheram-se amostras (1000mL) para se proceder a análises moleculares, nomeadamente identificação/quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas.

As amostras foram transportadas até ao laboratório em malas térmicas com termoacumuladores para manutenção da temperatura a 4ºC e, processadas num período não superior a 24h.

2.3 – Identificação e isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas por microscopia

A identificação taxonómica das estirpes foi efectuada através de observação microscópica, tendo por base as características morfológicas discriminativas citadas para identificação sistemática de espécies algais tais como a forma, tipo, dimensão e posicionamento das colónias, disposição e dimensão das células vegetativas e das células apicais, presença ou ausência de células especializadas e sua forma (heterocistos e acinetos) e presença ou ausência de baínha (Van den Hoek *et al.* 1995) Komarek and Anagnostidis 1998) (Komarek and Anagnostidis 2005).

A identificação fenotípica foi posteriormente confirmada por sequenciação molecular.

2.3.1 – Isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas

O isolamento das estirpes de cianobactérias foi realizado num período de 24h após a colheita. Das amostras foram retiradas várias colónias de todos os géneros de cianobactérias identificados, com o auxílio de um microscópio óptico (Leica DMLB) acoplado a uma câmara (Leica ICCA), com o software Leica Qwin Colour (Leitz, Alemanha) numa ampliação de 10x/40x e, pipetas de *Pasteur* estiradas à chama. Após a sua captura com a pipeta de *Pasteur* as colónias foram lavadas, sucessivamente, em várias gotas de água destilada estéril para a remoção da maioria dos contaminantes (Andersen 2005). Depois deste procedimento as colónias foram inoculadas de forma asséptica em tubos de ensaio de rolha estéreis com 5 ml meio de cultura Z8 estéril (Kotai 1972). Para garantir o isolamento das estirpes de cianobactérias dominantes, alíquotas da amostra ambiental foram também inoculadas através do método de espalhamento em placas de Petri com meio de cultura Z8 sólido (1,5% de agar) estéril numa câmara de fluxo laminar (Crumair). Para facilitar o isolamento das cianobactérias foi adicionado ao meio de cultura um algicida – cicloheximida (Sigma-Aldrich, Germany) numa concentração final de 100 µg/L (Andersen 2005). Os tubos e as placas foram incubados a 25±1ºC com um fotoperíodo 14:10 (luz:escuro) durante 1 mês. O crescimento das culturas foi analisado regularmente. As culturas que apresentaram maior crescimento nos tubos de ensaio e placas de Petri, foram repicadas para novas placas de Petri com meio de cultura Z8 sólido estéril através do método de estrias/riscado, de modo a proceder ao seu isolamento. Após a purificação as estirpes foram inoculadas em frascos estéreis de

filtro de ar (OrangeScientific, EU) com 25 ml de meio de cultura Z8, e foram incubadas nas mesmas condições para crescimento de biomassa. Quando as culturas atingiram a fase exponencial foram transferidas para frascos estéreis com filtro de ar com 50 ml de meio de cultura Z8 e, incubadas nas mesmas condições, permitindo manter o stock permanente de estirpes monoalgais, em culturas não axénicas.

2.4 – Identificação genotípica e quantificação de cianobactérias e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por métodos moleculares

2.4.1 – Extracção de DNA

Para as amostras ambientais procedeu-se à filtração dos respectivos volumes colhidos através de um sistema de filtração por vácuo (Gelman Sciences), com filtros estéreis GF/C de 47 mm, com uma porosidade de 1,2 µm (Whatman, Engle). Os volumes filtrados divergiram de acordo com a turvação da água, tendo-se definido como critério o volume necessário para colmatar a membrana. Os filtros foram congelados a -20ºC até se proceder à sua raspagem. Quando oportuno todo o conteúdo dos filtros foi cuidadosamente raspado com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocado num tubo eppendorf estéril para posterior extracção do DNA.

Para as amostras das culturas isoladas, o DNA foi extraído de culturas vivas, concentradas por centrifugação. Para tal retirou-se 1 ml da cultura para um eppendorf estéril e centrifugou-se (Eppendorf 5415R) durante 5 min (minutos) a 13 200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e os *pellets* celulares foram sujeitos a um ciclo de congelação/descongelação a -20ºC até à extracção.

O DNA genómico das amostras foi extraído com o Kit Purelink genomic DNA purification (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante para bactérias Gram-negativas, com algumas alterações. Sempre que as amostras estavam muito concentradas, duplicou-se o volume de tampão de digestão durante o procedimento de lise celular. Além disso, definiu-se em 100 µL o volume de tampão de eluição utilizado.

Para confirmar a presença e integridade do DNA genómico, procedeu-se a electroforese em gel de agarose (15x15 cm) (Molecular Biology Agarose, Biorad) a 1,5% (P/V), corado com brometo de etídio (10mg/mL, Biorad), na solução tampão Tris-Acetato EDTA (TAE 1X Biorad – 40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA, pH de 8,3). Para tal, utilizou-se uma tina de electroforese (Sub-Cell GT, Biorad), e aplicou-se uma

voltagem constante de 90 volts durante 45 min. Os poços foram carregados com 5 µL de DNA e 2 µL de Loading Dye a 1x (Nucleic acid sample loading buffer 5X, Biorad). O DNA genómico foi visualizado directamente da fluorescência do brometo de etídio sob influência da luz ultravioleta no gel de agarose com um transiluminador (Cleaver Scientific) e fotografado. Além disso, a quantidade de DNA extraído da amostra foi medido por fluorometria (Qubit, Invitrogen) em µg/mL.

2.4.2 – Amplificação e identificação por PCR convencional

2.4.2.1 – Amplificação do gene *16S rRNA* das amostras ambientais e culturas isoladas

O gene *16S rRNA* é o mais utilizado na identificação de cianobactérias. A amplificação do **gene *16S rRNA*** foi efectuada através de uma reacção de PCR para um volume final de 20 µL, usando as proporções dos componentes referidos na tabela 1. Os pares de *primers* (oligonucleótidos) utilizados foram o 27F(FW)/809R(Rv) e o 740F(Fw)/1494R(Rv) (Neilan *et al.* 1997), que amplificam um fragmento de 780 pb e 754 pb, respectivamente (tabela 3). O esquema de amplificação no termociclador profissional (Biometra, Germany) incluiu uma fase de desnaturação inicial de 2min a 92ºC e 35 ciclos com as seguintes fases: (1) desnaturação do DNA em cadeia dupla durante 20s (segundos) a 92ºC, (2) emparelhamento dos *primers* ao DNA molde durante 30s a 90ºC, e (3) extensão pela *Taq* DNA polimerase durante 1min a 72ºC. A extensão final foi durante 5min a 72ºC.

O produto de PCR foi confirmado por electroforese, num gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 volts por 45 min. Os poços foram carregados com 8 µL de produto de PCR e 2 µL de Loading Dye a 1x. O marcador utilizado foi de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A concentração e integridade do DNA foi fotografada directamente da fluorescência do brometo de etídio sob influência da luz ultravioleta no transiluminador.

Tabela 1 – Quantidades de cada componente utilizado para a reacção de PCR.

Componente	1x (µl)
DNA da amostra (5 a 10 ng)	2
Tampão de PCR 10x NH_4 Reaction Buffer (Bioline)	2
dNTPs a 2,5 mM (Bioline)	2
$MgCl_2$ a 50 mM (Bioline)	1
Primer Fw a 2,5 mM (Invitrogen)	1
Primer Rv a 2,5 mM (Invitrogen)	1
BSA (Bovine serum albumin)	0,5
Taq DNA Polimerase a 5U/µL (Bioline)	0,1
H_2O	10,4

2.4.2.2 – Preparação das amostras das culturas isoladas para sequenciação molecular

Procedeu-se à amplificação do gene *16S rRNA* por reacção de PCR convencional para um volume final de 100 µL com as quantidades dos componentes referidos na tabela 1. Os pares de *primers* utilizados foram o 27F(FW)/809R (Rv) e o 740F(Fw)/1494R (Rv) com a sequência referida na tabela 3. Foi efectuado um controlo positivo (*Microcystis aeruginosa* - M6) e um controlo negativo. O esquema de amplificação foi igual ao anteriormente referido no ponto 2.4.2.1.

O produto de PCR foi confirmado por electroforese, num gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 volts por 45 min. Os poços foram carregados com 5 µL de produto de PCR e 2 µL de Loading Dye a 1x. A concentração e integridade do DNA foi fotografada directamente da fluorescência do brometo de etídio sob influência da luz ultravioleta no transiluminador.

Após a confirmação de amplificação, as amostras foram purificadas com o Kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com o recomendado pelo fabricante com alteração no último passo, no qual, a amostra foi eluída em 30 µL de água ultrapura.

O produto de amplificação purificado das culturas isoladas, com os referidos pares de *primers* foram enviados para a empresa STABVIDA, que determinou a sequência amplificada. Esta sequência foi depois inserida na base de dados BLASTn (Basic Local Alignmente Search Tool for Nucleotide) integrada no GenBanK da NCBI (National Centre for Biotechnology Information), no site "http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/", determinando-se assim qual o género/espécie presente em cada cultura isolada.

Para tornar a sequência obtida mais completa, uma vez que se amplificou a mesma região nos dois sentidos (5'-3') e (3'-5'), utilizaram-se mais dois programas, um

para reverter a sequência e completar a anterior "http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html" e outro para alinhar as sequências "http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html" respectivamente. A sequência que mais se identificava com a caracterização fenotípica, e tinha uma combinação máxima de score e similaridade com o organismo sequenciado foi a seleccionada.

2.4.2.3 – Amplificação de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas das amostras ambientais e das culturas isoladas

Foi efectuada a amplificação de fragmentos de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e de fragmentos de genes implicados na biossíntese de toxinas, apenas após se ter obtido resultados positivos para o gene *16S rRNA*. Foi efectuada a amplificação para todas as amostras ambientais, no entanto, para as culturas isoladas só se amplificou os genes das cianobactérias potencialmente tóxicas que tinham sido pré-identificadas ao microscópio óptico, para confirmação. Em relação às mesmas amostras os genes responsáveis pela biossíntese de toxinas foram amplificados para todas as culturas como forma de efectuar um rastreio.

As cianobactérias potencialmente tóxicas pesquisadas foram a ***Microcystis*** e a ***Cylindrospermopsis***, utilizando os pares de *primers* Micr184(Fw)/Micr431(Rv) *16S rRNA* específico para *Microcystis* (Neilan *et al.* 1997) e, Cyl2(Fw)/Cyl4(Rv) *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* (Wilson *et al.* 2000), que amplificam um fragmento de 220 pb e 300pb, respectivamente (tabela 3). O esquema de amplificação para o gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* incluiu uma fase de desnaturação inicial de 2min a 92ºC e 35 ciclos com as seguintes fases: (1) desnaturação do DNA em cadeia dupla durante 20s a 92ºC, (2) emparelhamento dos *primers* ao DNA molde durante 30s a 56ºC, e (3) extensão pela *Taq* DNA polimerase durante 1min a 72ºC. A extensão final foi durante 5min a 72ºC. O esquema de amplificação para o gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* incluiu uma fase de desnaturação inicial de 2min a 95ºC e 35 ciclos com as seguintes fases: (1) desnaturação do DNA em cadeia dupla durante 90s a 95ºC, (2) emparelhamento dos *primers* ao DNA molde durante 30s a 55ºC, e (3) extensão pela *Taq* DNA polimerase durante 50s a 72ºC. A extensão final foi durante 7min a 72ºC.

A pesquisa genes responsáveis pela biossíntese de toxinas, foi direccionada para as cianotoxinas microcistina e a cilindrospermopsina. Para a identificação de genes responsáveis pela síntese de microcistina utilizaram-se os pares de *primers mcyA*-

Cd1F/*mcyA*-Cd1R, ***microcistina sintetase A*** (Hisbergues *et al.* 2003); *mcyB* 2959F/*mcyB* 3278F ***microcistina sintetase B* (*Microcystis*)** (Nonneman and Zimba 2002) e *mcyE*-F2 (Fw)/*mcyE*-R4(Rv) ***microcistina sintetase E*** (Rantala *et al.* 2004), para amplificar fragmentos de 297 pb; 350 pb e 812 pb, respectivamente (tabela 3). O esquema de amplificação para os genes *mcyA* e *mcyB* foi o mesmo do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*. O esquema de amplificação para o gene *mcyE* incluiu uma fase de desnaturação inicial de 5min a 94ºC e 35 ciclos com as seguintes fases: (1) desnaturação do DNA em cadeia dupla durante 60s a 95ºC, (2) emparelhamento dos *primers* ao DNA molde durante 30s a 52ºC, e (3) extensão pela *Taq* DNA polimerase durante 1min a 72ºC. A extensão final foi durante 7min a 72ºC. Para complementar a análise foi também efectuada a pesquisa do gene ***microcistina/nodularina sintetase*** através do par de *primers* HepF(Fw)/HepR(Rv) (tabela 3) (Jungblut and Neilan 2006) que amplifica um fragmento de 472 pb. O esquema de amplificação para o par de *primers Hep* foi o mesmo do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* com a excepção da temperatura da fase de emparelhamento dos *primers* ao DNA molde que foi de 52ºC. A extensão final foi durante 7min a 72ºC.

Para a identificação de genes responsáveis pela biossíntese de cilindrospermopsina utilizaram-se os pares de *primers* M13(Fw)/M14(Rv) **c*ilindrospermopsina peptide synthethase* (PS)** (Schembri *et al.* 2001); M4(Fw)/M5(Rv) ***cilindrospermopsina polyketide synthase* (PKS)** (Schembri *et al.* 2001) e AMT(Fw)/AMT(Rv) ***cilindrospermopsina amidinotransferase* (AMT)** (Kellman *et al.* 2006) que amplificam fragmentos de 597 pb, 650 pb e 1105 pb, respectivamente (tabela 3). O esquema de amplificação para o gene PS e PKS foi o mesmo do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis.* O esquema de amplificação para o gene AMT incluiu uma fase de desnaturação inicial de 3min a 94ºC e 30 ciclos com as seguintes fases: (1) desnaturação do DNA em cadeia dupla durante 10s a 94ºC, (2) emparelhamento dos *primers* ao DNA molde durante 20s a 50ºC, e (3) extensão pela *Taq* DNA polimerase durante 1min a 72ºC. A extensão final foi durante 7min a 72ºC.

Todas as reacções de PCR foram executadas para um volume final de 20 µL contendo os componentes nas proporções referidas na tabela 1. Em todas as reacções de PCR foi feito um controlo positivo (**M6** (*Microcystis aeruginosa)* para o gene *16S rRNA*, identificação de *Microcystis* e genes implicados na biossíntese de microcistina e o **AQS** (*Cylindrospermopsis raciborskii)* para identificação de *Cylindrospermopsis* e genes implicados na biossíntese de cilindrospermopsina) e um controlo negativo.

O produto de PCR foi confirmado por electroforese, num gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 volts por 45 min. Os poços foram carregados com 8 µL de produto de PCR e 2 µL de Loading Dye a 1x. A concentração e integridade do DNA foi fotografada directamente da fluorescência do brometo de etídio sob influência da luz ultravioleta no transiluminador.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados**.**

Primer	Sequência (5' → 3')	Referência
27F Fw ***809R Rv***	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA	**Neilan *et al*., 1997**
740F Fw ***1494R Rv***	GGCYRWAWCTGACACTSAGGGA TACGGTTACCTTGTTACGAC	**Neilan *et al*., 1997**
CYL 2 Fw ***CYL 4 Rv***	GGCATTCCTAGTTATATTGCCATACTA GCCCGTTTTTGTCCCTTTGCTGC	**Wilson *et al*., 2000**
Micr 184F Fw ***Micr 431R Rv***	GCCGCRAGGTGAAAMCTAA AATCCAAARACCTTCCTCCC	**Neilan *et al*., 1997**
mcyA - CD1F Fw ***mcyA -CD1R Rv***	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	**Hisbergues *et al*., 2003**
mcyB-2959F ***mcyB3278R***	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC	**Nonneman e Zimba, 2002**
mcyE-F2 Fw ***mcyE-R4 Rv***	GAA ATT TGT GTA GAA GGT GC AAT TCT AAA GCC CAA AGA CG	**Rantala *et al*., 2004**
HEPF Fw ***HEPR Rv***	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGCCATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	**Jungblut e Neilan, 2006**
PKS M4 Fw ***PKS M5 Rv***	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA AATCCTTACGGGATCCGGTGC	**Schembri *et al*., 2001**
M13 Fw ***M14 Rv***	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAACATCGCTCACTGGTG	**Schembri *et al*., 2001**
AMT Fw ***AMT Rv***	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG TTAGGGAAGTAATCTTCACAG	**Kellman *et al*., 2006**
Cya359F Fw ***Cya781R Rv***	GGGGAATYTTCCGCAATGGG GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT T	**Nübel *et al*., 1997**

2.4.3 – Amplificação, identificação e quantificação por PCR em tempo real

A identificação e quantificação por PCR em tempo real foi feita para *o* ***gene 16S rRNA*** com o par de *primers* Cya359F(Fw)/Cya781R(Rv) (Nübel *et al.* 1997), (tabela 3). As cianobactérias potencialmente tóxicas analisadas por este método foram ***Cylindrospermopsis*** **e** ***Microcystis***, com os mesmos pares de *primers* utilizados por PCR convencional. Foi também feita identificação/quantificação de um gene responsável pela síntese de microcistina, o gene ***microcistina sintetase A*** (*mcyA*), (tabela 3), com os mesmos pares de *primers* utilizados por PCR convencional.

As condições da reacção para a detecção e quantificação do gene *16S rRNA* incluíram uma desnaturação inicial a 95ºC durante 5min, seguida de 50 ciclos a 95ºC durante 15s, 60º durante 15s e 72ºC durante 30s. A temperatura de *Melting* correspondente foi de 87/87,5ºC. O limite de detecção foi de 12 cel/mL.

As condições da reacção para a detecção e quantificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* incluíram uma desnaturação inicial a 95ºC durante 5min, seguida de 40 ciclos a 95ºC durante 15s, 52º durante 30s e 72ºC durante 30s. A temperatura de *Melting* correspondente foi de 87,5/88ºC. O limite de detecção foi de 1,2 cel/mL.

As condições da reacção para a detecção e quantificação do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* incluíram uma desnaturação inicial a 95ºC durante 8min, seguida de 50 ciclos a 95ºC durante 15s, 55º durante 15s e 72ºC durante 50s. A temperatura de *Melting* correspondente foi de 80,5/81ºC. O limite de detecção foi de 100 cel/mL.

As condições da reacção para a detecção e quantificação do gene *mcyA* incluíram uma desnaturação inicial a 95ºC durante 5min, seguida de 40 ciclos a 95ºC durante 15s, 59º durante 30s e 72ºC durante 50s. A temperatura de *Melting* correspondente foi de 81/81,5ºC. O limite de detecção foi de 16 cel/mL.

Todas as reacções de PCR em tempo real foram preparadas com 5µL de amostra (5 a 10 ng de DNA), 0,4 µM de cada par de *primers* referido e 1x IQ SYBR Supermix (Biorad), num volume final de 25µL.

A amplificação/quantificação foi efectuada no termociclador BioRad iCycler equipado com sistema de detecção de fluorescência em tempo real iQ. As curvas standard foram baseadas na concentração de células predeterminadas de *Microcystis aeruginosa* (**M6**), relacionando a concentração de DNA (em células equivalentes) com os valores de Ct (Cycle treshold) nas amostras (anexo 3).

2.5 - Quantificação de toxinas (microcistina-LR equivalente e cilindrospermopsina) por ELISA

2.5.1 – Preparação das amostras

Esta análise foi efectuada para as amostras ambientais e para as culturas isoladas em que se obteve um resultado positivo no PCR convencional para a presença de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e/ou genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas. Volumes de 15 ml das amostras ambientais e das culturas isoladas em meio Z8 foram liofilizadas (EZ-DRY, FTS Systems, USA) durante 72h. O liofilizado foi dissolvido em 5 mL de água desionizada ultrapura. A mistura foi sonicada a uma amplitude de 80 Hz durante 5min em banho de gelo, utilizando uma sonda de ultrassons (Vibra Cell – Sonics & Materials Inc. Danbury, CT, USA). Após esta preparação, as amostras foram submetidas a ciclos de congelação/descongelação para facilitar a lise celular.

O preparado foi filtrado por um filtro de 0,22 µm (Orange Scientific, Belgium). Seguidamente para algumas amostras fizeram-se diluições de 1:10 com água ultrapura para garantir que pelo menos um dos valores se encontrasse dentro da curva de calibração do método. O preparado foi congelado a -4ºC até à elaboração do teste ELISA.

2.5.2 - Ensaio ELISA

Os ensaios ELISA foram efectuados para quantificação de microcistina e cilindrospermopsina. Executou-se esta análise com amostras tratadas de acordo com o ponto 2.5.1 e com amostras sem qualquer tratamento que são definidas nos resultados como amostras ambientais.

Para a quantificação de **microcistina** utilizou-se o Kit de ELISA EnviroGard® Microcystins Plate Kit, USA. Este Kit permite detectar a presença de microcistina-LR, microcistina-RR, microcistina-YR e nodularinas, em diferentes concentrações. O princípio do método baseia-se no uso de anticorpos policlonais anti-microcistinas. Estes anticorpos ligam-se às microcistinas e aos conjugados microcistina-enzima (peroxidase). Os anticorpos estão imobilizados nas paredes dos poços do Kit e as microcistinas da amostra competem com o conjugado por um número limitado de locais de ligação específicos dos anticorpos. Como o número de locais de ligação a anticorpos é igual em todos os poços, e cada poço recebe o mesmo número de moléculas de conjugado microcistina-enzima, uma amostra que contenha uma baixa concentração de microcistinas resulta numa elevada taxa de ligação de anticorpos a moléculas de

conjugado, resultando uma solução azul escura. Caso haja uma elevada concentração de microcistinas na amostra resulta uma cor azul claro. Esta taxa de ligação é medida espectrofotometricamente após a adição de um substrato que é convertido pela peroxidase num produto que absorve a 450 nm. O limite de detecção do Kit de ELISA utilizado é de 0,1 µg/L de microcistina-LR equivalente. Para cada ensaio foi elaborada a curva de calibração, com 6 soluções padrão (0,1; 0,2; 0,4; 0,56; 0,8; 1,6 µg/L) presentes no Kit. Foi também efectuado um controlo negativo. As amostras foram aplicadas em duplicado nos poços da microplaca fornecida com o Kit. O procedimento efectuado foi de acordo com as instruções do fabricante, com a excepção da incubação das amostras com o substrato que foi feita no escuro. A absorvância a 450 nm foi determinada num leitor de placas (Biotek Synergy HT, USA).

Para a quantificação de **cilindrospermopsina** utilizou-se o Kit ELISA Abraxis® Microtiter Plate. O princípio do teste é baseado no reconhecimento de cilindrospermopsina por anticorpos específicos. Quando a toxina está presente na amostra compete com o conjugado cilindrospermopsina-HRP pelos locais específicos do anticorpo presente em solução. Estes primeiros anticorpos ligam-se depois a uns segundos anticorpos que estão imobilizados na parede de cada poço da placa. Como o número de locais de ligação a anticorpos é igual em todos os poços, e cada poço recebe o mesmo número de moléculas de conjugado cilindrospermopsina-HRP, uma amostra que contenha uma baixa concentração de cilindrospermopsina resulta numa elevada taxa de ligação de anticorpos a moléculas de conjugado, resultando numa solução azul escura, uma vez que a intensidade da cor azul é inversamente proporcional à concentração de cilindrospermopsina presente na amostra. Esta taxa de ligação é medida espectrofotometricamente por um produto final que absorve a 450 nm. O limite de detecção do Kit de ELISA utilizado é de 0,04 µg/L de cilindrospermopsina. Para cada ensaio foi elaborada a curva de calibração, com as 6 soluções padrão (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 µg/L) presentes no Kit. Foi também efectuado um controlo positivo (0,75 µg/L). As amostras foram aplicadas em duplicado nos poços da microplaca fornecida com o Kit. O procedimento efectuado foi de acordo com as instruções do fabricante. A absorvância a 450 nm foi determinada no mesmo leitor de placas.

A concentração de microcistina-LR equivalente e cilindrospermopsina nas amostras foi calculada por interpolação entre razão da média dos valores de absorvância dos padrões/amostra e da média dos valores de absorvância do controlo negativo. A concentração de microcistina e cilindrospermopsina é apresentada em µg/L. Amostras cujo coeficiente de variação foi superior a 15% não foram consideradas válidas por falta de reprodutibilidade (Gkelis *et al.* 2006). Concentrações inferiores a 0,2 µg/L foram consideradas zero.

2.6 – Quantificação de toxina (microcistina) por HPLC

2.6.1 - Preparação das amostras

Procedeu-se à filtração dos respectivos volumes colhidos através de um sistema de filtração por vácuo, com filtros estéreis GF/F de 47 mm, com uma porosidade de 0,45µm. Os filtros foram congelados a -20ºC até à sua análise.

Depois de descongelados, ressuspendeu-se os filtros com as amostras em metanol a 20%. De seguida a mistura foi submetida a ultrassons durante 5 min com uma amplitude de 60 Hz em banho de gelo. Deixou-se a mistura *overnight* no frigorífico. Após este período a mistura foi centrifugada durante 10 min a 4150 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi retirado para um gobelé e deixou-se na hotte em banho-maria (40ºC) até evaporar completamente. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 1000 µL de metanol a 50%. As amostras foram colocadas nos frascos de HPLC e depois num carreto para o injector automático do sistema HPLC. Foi injectado 100 µL de cada amostra.

2.6.2 - Aplicação do método HPLC

A aplicação desta metodologia foi efectuada apenas para confirmar a presença de microcistina nas amostras cujo resultado foi positivo por ELISA.

A concentração de microcistina-LR nas amostras foi determinada de acordo com a metodologia de (Pflugmacher *et al.* 2006) com algumas modificações. O princípio do método baseia-se na leitura cromatográfica dos elementos constituintes de uma amostra, comparando o tempo de retenção do padrão, com o tempo de retenção das moléculas a investigar. O padrão utilizado neste trabalho foi de microcistina-LR com um tempo de retenção de 12,23 minutos. Foi utilizado um sistema de cromatografia da Merck-Hitachi, com um sistema de detecção de fotodíodos. A separação das microcistinas foi obtida usando uma coluna de 5µm ODS (sistema de cartuchos LiChroCART®250-4, Merck, Germany). O gradiente usado na fase móvel foi de 28 a 70% de acetronitrílo durante 30 min. O espectro UV, para cada fracção, foi testado e as variantes de microcistina foram identificadas numa fase preliminar, pelas suas características face ao espectro UV (Absorvância UV λ_{max} a 238-240 nm). O limite de detecção de microcistina-LR por este método é de 0,1 µg/mL.

A presença de microcistina-LR foi confirmada e quantificada, por comparação, dos tempos de retenção e das áreas dos picos dos cromatogramas das amostras com os padrões.

2.8 – Análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) para detecção de microcistinas

A detecção de microcistinas e outras moléculas por MALDI-TOF MS foi efectuada para confirmar se as culturas isoladas, cujo resultado foi positivo para genes responsáveis pela biossíntese de microcistina continham, efectivamente, a toxina. As amostras foram liofilizadas previamente durante 120h. O liofilizado foi colocado em tubos eppendorf e as amostras foram enviadas para análise na Universitat de Berlin na Alemanha. A massa correspondente a microcistina-LR é de 995,6 *m/z*.

2.9 – Tratamento dos Resultados

O tratamento dos dados para determinar a concentração de microcistina e cilindrospermopsina por ELISA; a concentração de microcistina por HPLC e o número de células/mL por PCR em tempo real foi efectuado com o software Microsoft Excel – Windows 2007. Todos os gráficos e tabelas apresentados tiveram como suporte o mesmo software.

3 - Resultados

3.1 - Análise físico-química

Na figura nº 6 e 7 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas da água da lagoa de Mira no momento das amostragens. Nesta lagoa, figura nº6, o oxigénio dissolvido, diminuiu de 8,3 para 5,9 mg/L desde 26-Jun até 27-Ago, registando-se depois um aumento para 13,1 mg/L em 22-Out. A temperatura variou desde a primeira amostragem até 24-Set entre os 21 e 25ºC, diminuindo para 16ºC na última amostragem (22-Out).

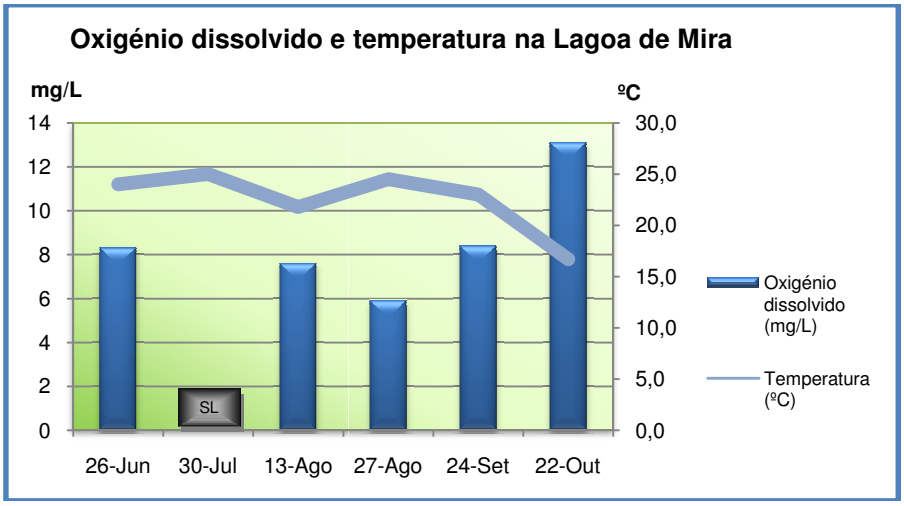


Figura nº 6 – Resultados da análise de oxigénio dissolvido e temperatura nas amostras da lagoa de Mira. SL – Sem leitura.

O pH manteve-se praticamente constante, aproximadamente 9, na lagoa de Mira, como se observa na figura nº7. Relativamente à condutividade, esta foi aumentando ao longo das amostragens. O valor mais elevado verificou-se em 22-Out com 468 µS/Cm.

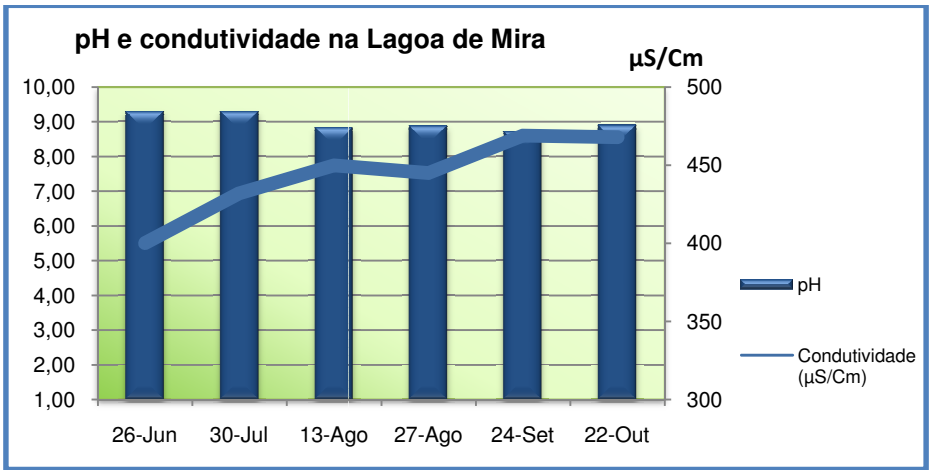


Figura nº 7 – Resultados da análise do pH e condutividade das amostras da lagoa de Mira.

As figuras nº8 e 9 apresentam os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos da água da lagoa da Vela nas respectivas datas de amostragem. Como se observa na figura nº8, o oxigénio dissolvido variou entre os 8 e 10 mg/L, com a excepção da amostra de 24-Set em que se registou uma concentração de 13 mg/L. A temperatura diminuiu cerca de 10ºC, da primeira amostragem (28,5ºC) para a última amostragem (19ºC).

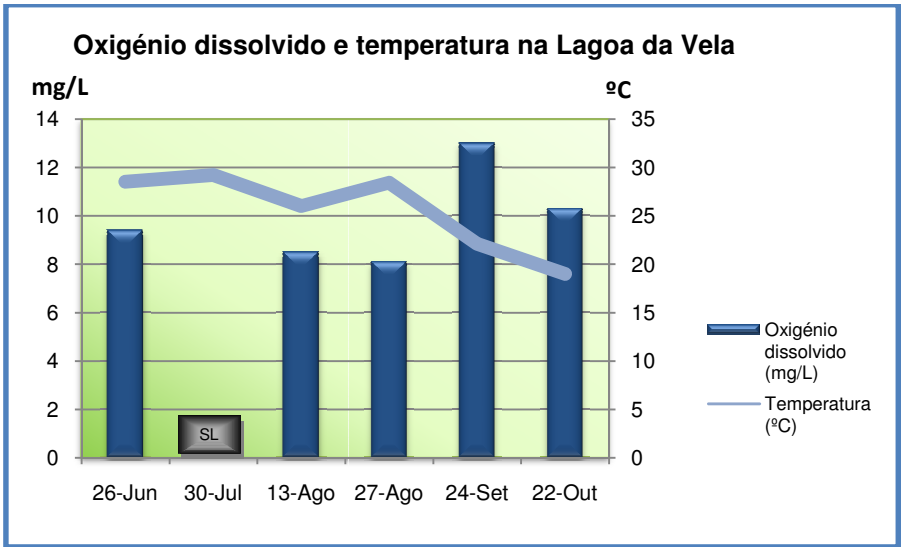


Figura nº 8- Resultados da análise de oxigénio dissolvido e temperatura das amostras da lagoa da Vela. SL – Sem leitura.

O pH e a condutividade, nesta lagoa seguem os mesmos padrões da lagoa de Mira (figura nº9). O pH é de aproximadamente 9 em todas as datas de amostragem. A

condutividade também vai aumentando ao longo das datas de amostragem, no entanto, os valores são muito superiores aos da lagoa de Mira, inclusive a água apresentava níveis de turvação elevados. O valor máximo de condutividade registado foi de 893 µS/Cm na última data de amostragem.

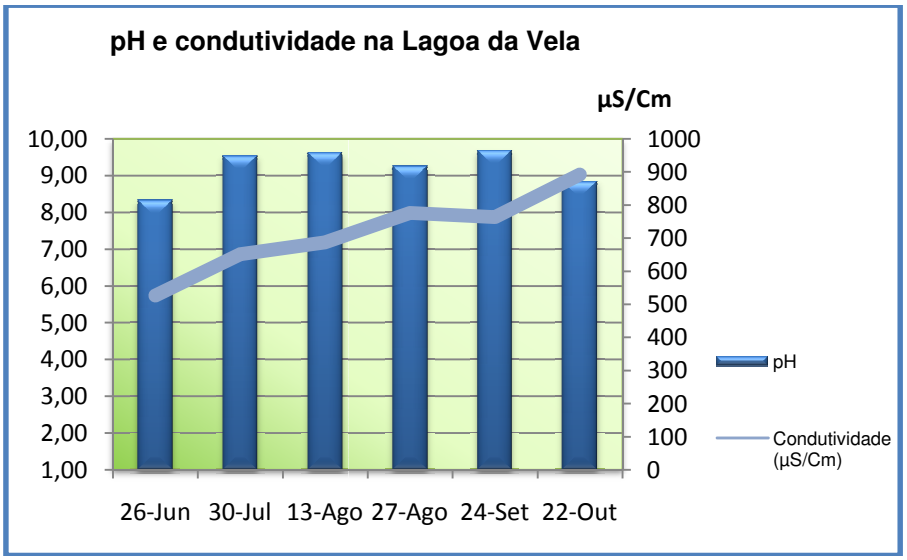


Figura nº 9 – Resultados da análise do pH e condutividade das amostras da lagoa da Vela.

3.2 – Comparação de métodos de monitorização de cianobactérias e suas toxinas em amostras ambientais

Os métodos utilizados para a detecção de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas amostras ambientais foram baseados em técnicas moleculares (PCR convencional e PCR em tempo real). Para a quantificação de eventuais cianotoxinas presentes nas amostras foram utilizados ensaios enzimáticos ELISA. A quantificação de toxina foi posteriormente confirmada por HPLC.

3.2.1– Identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional

Em todas as amostras ambientais foi confirmada a presença de cianobactérias, algumas das quais potencialmente tóxicas. A presença do gene *16S rRNA* em todas as amostras (tabela nº 4 e figura nº 10), indica que todas contêm DNA de cianobactéria.

Como se pode observar na mesma tabela, em ambas as lagoas se verifica a presença do género *Microcystis*, pois o resultado foi positivo em todas as amostras para o gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*. Na lagoa da Vela também se observa a presença de genes implicados na biossíntese de microcistinas/nodularina (gene *mcyE* e fragmento amplificado com os *primers* Hep), nomeadamente nas últimas datas de amostragem. Em relação à presença de *Cylindrospermopsis*, obteve-se resultados positivos para todas as amostras da lagoa da Vela, no entanto, não se observou a presença de genes implicados na biossíntese de cilindrospermopsina em nenhuma das amostras (tabela nº4).

Tabela 3 – Resultados da amplificação por PCR convencional de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas amostras ambientais.

Local de Amostragem	**Mira**						**Vela**					
Data de amostragem / **Fragmentos amplificados**	**26-Jun**	**30-Jul**	**13-Ago**	**27-Ago**	**24-Set**	**22-Out**	**26-Jun**	**30-Jul**	**13-Ago**	**27-Ago**	**24-Set**	**22-Out**
16S rRNA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16S rRNA Microcystis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
mcyA	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
mcyB	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
mcyE	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✓
Hep	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✓
rpoC1 Cylindrospermopsis	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PKS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
PS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
AMT	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

✓ - Resultado positivo; ✗ **-** Resultado negativo.

A figura nº 10 corresponde á imagem do gel de agarose com o produto de amplificação por PCR convencional de um fragmento de 780pb, relativo ao gene *16S rRNA,* das amostras ambientais das lagoas de Mira e Vela.

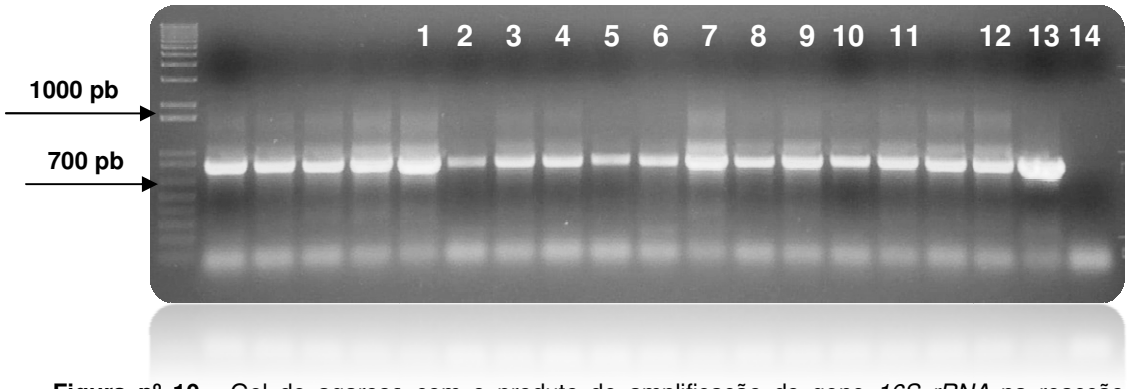


Figura nº 10 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 780 pb. 1- Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; 13- Controlo positivo; e 14- Controlo negativo.

As imagens em gel de agarose com os restantes produtos amplificados por PCR convencional encontram-se no anexo 1.

3.2.2 – Identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real

Nas figuras nº 11 e 12 estão apresentados os resultados relativos à identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real, nas amostras das lagoas de Mira e Vela, respectivamente. Como se pode verificar na figura nº11 a quantidade de cianobactérias na lagoa de Mira vai aumentando de $3{,}16x10^{2}$ cel/mL, na primeira data de amostragem, para $9{,}95x10^{4}$ cel/mL em 27-Ago. Em 24-Set verifica-se uma diminuição da quantidade de cianobactérias para $2{,}01x10^{3}$ cel/mL. Na última data de amostragem há um ligeiro aumento, no entanto, a quantidade mantêm-se na mesma ordem de grandeza. A densidade celular de *Microcystis* varia bastante consoante as datas de amostragem. Na amostra de 26-Jun a quantificação, em células equivalentes, do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* foi superior à do gene *16S rRNA* de cianobactéria. Em 24-Set é quando se observa a quantidade mais baixa de *Microcystis* de todas as datas de amostragem, cerca de $1{,}01x10^{1}$ cel/mL.

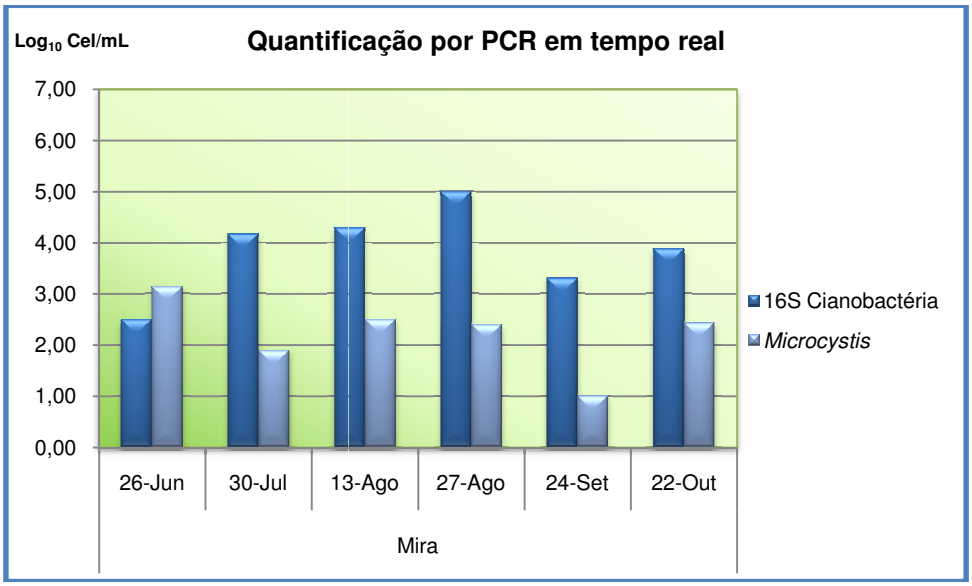


Figura nº 11 - Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas, correspondentes às amostras ambientais da lagoa de Mira.

Como se pode observar na figura nº12 há uma quantidade substancial de cianobactérias em todas as datas de amostragem da lagoa da Vela (aproximadamente $1x10^8$ cel/mL). *Cylindrospermopsis* é a cianobactéria dominante. Apresenta densidades celulares na ordem de $1x10^6$ cel/mL nas primeiras quatro amostragens, aumentando nas duas últimas amostragens para a ordem de $1x10^7$ cel/mL. Em 22-Out praticamente todas as cianobactérias presentes na lagoa da Vela são *Cylindrospermopsis*, pois a diferença de valores entre o gene *16S rRNA* de cianobactéria e o gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* é residual.

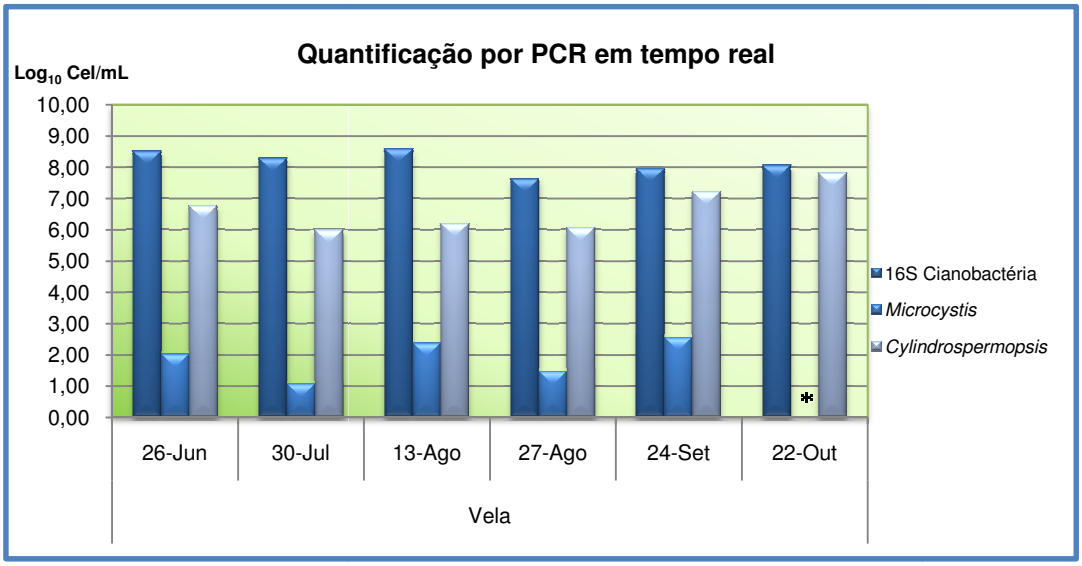


Figura nº 12 - Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas, correspondentes às amostras ambientais da lagoa da Vela. * -Detectado mas não quantificado.

Quanto à presença de *Microcystis* na lagoa da Vela, constata-se que é mais baixa em relação a *Cylindrospermopsis*, apresentado densidades máximas na ordem de $1x10^2$ cel/mL. Na última data de amostragem *Microcystis* foi detectada, no entanto, não foi possível a sua quantificação pelo facto de estar em escassa quantidade.

3.2.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente e cilindrospermosina) por ELISA

Na figura nº13 estão apresentados os resultados da quantificação de microcistina-LR equivalente nas amostras das lagoas de Mira e Vela. Os resultados mostram que na lagoa da Vela as amostras tratadas têm uma concentração de microcistina-LR equivalente superior à concentração das amostras ambientais, sendo que, em algumas delas os valores diferem substancialmente, variando de concentrações que são assumidas como zero (amostras ambientais) para concentrações superiores a 1µg/L (amostras tratadas) (Vela 22-Out). As amostras da lagoa da Vela de 24-Set, por exemplo, variam na ordem dos 6 µg/L. Na lagoa de Mira isto não se verifica, aliás há amostras ambientais em que se quantificou uma maior concentração de microcistina-LR equivalente do que nas amostras tratadas. No entanto, as concentrações de microcistina-LR equivalente na lagoa de Mira são muito baixas, a maioria delas é inferior a 0,2 µg/L, sendo portanto consideradas zero.

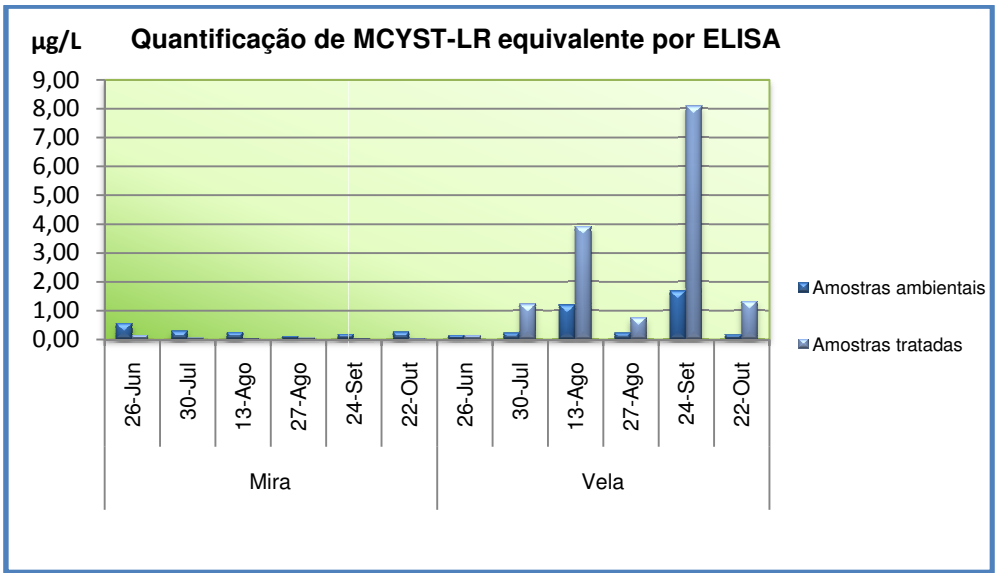


Figura nº 13 – Quantificação da concentração de microcistina-LR equivalente por ELISA em amostras ambientais e tratadas das lagoas de Mira e Vela.

Quanto à concentração de cilindrospermopsina nas amostras ambientais e tratadas da lagoa da Vela, esta foi sempre inferior ao limite estabelecido (0,2 µg/L), constatando-se, portanto, a não existência desta toxina nas respectivas amostras.

3.2.5 – Quantificação de toxina (microcistina) por HPLC

Sempre que se obtém resultados positivos pelo teste ELISA, estes devem ser confirmados por HPLC. A quantificação foi por isso apenas efectuada para microcistinas para as amostras das lagoas de Mira e Vela. Embora nos cromatogramas da maioria das amostras tenha sido possível identificar pequenos picos no tempo de retenção correspondente ao padrão de microcistina-LR (12,23 min), foi considerada negativa a presença da toxina, pelo facto dos respectivos espectros UV não corresponderem à absorvância de microcistina-LR (238 nm) (anexo 4).

3.3 – Optimização de volumes de amostragem para monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas

A figura nº14 apresenta a concentração de DNA, obtida por fluorometria, após a extracção do mesmo nas amostras dos volumes analisados em termos de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas.

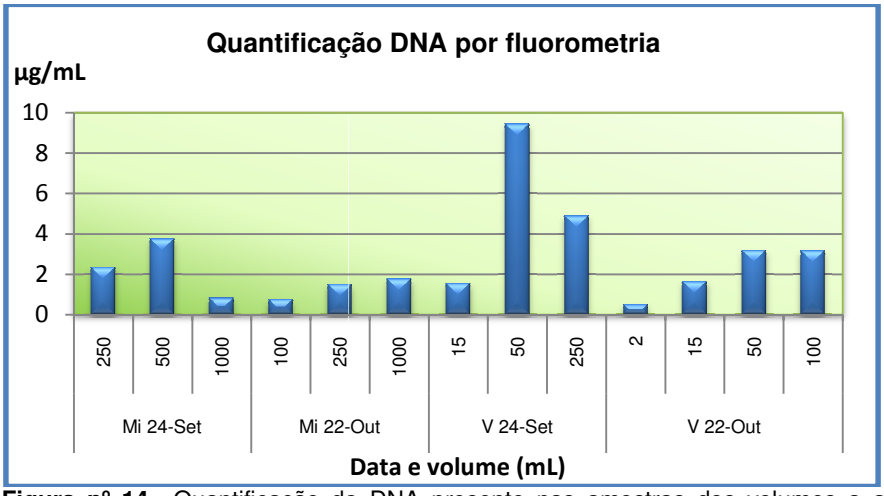


Figura nº 14– Quantificação do DNA presente nas amostras dos volumes a analisar após extracção do mesmo.

Como se pode verificar na presente figura, a concentração de DNA nas amostras de 24-Set das lagoas de Mira e Vela não são homogéneas, nem apresentam nenhum padrão de concentração de DNA relacionado com o volume amostrado. Nas amostras de 22-Out observa-se em ambas as lagoas um padrão de concentração de DNA em função do volume, ou seja, a quantidade de DNA aumenta gradualmente à medida que aumenta o volume, em mL, de amostra. A maior concentração de DNA extraído (9,45 µg/mL) corresponde à amostra do volume de 50 mL de 24-Set da lagoa da Vela.

3.3.1– Identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional

Na tabela nº5 estão apresentados os resultados relativos aos produtos amplificados por PCR convencional nas amostras dos volumes. Tal como para as amostras ambientais para todos os volumes amostrados se confirma a presença de cianobactérias e *Microcystis*. Também *Cylindrospermopsis* está presente em todos os volumes das amostras da lagoa da Vela.

No que concerne à presença de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas, constata-se que os resultados diferem dos que são apresentados para as amostras ambientais nas mesmas datas de amostragem. Nas amostras dos volumes nas datas de 24-Set e 22-Out da lagoa de Mira, os genes *mcyA*, *mcyE* e o fragmento que amplifica com os *primers* Hep foram detectados, contudo, isso não se verificou nas amostras ambientais. O mesmo se verifica para o gene *mcyA* na lagoa da Vela, que foi detectado em alguns volumes em 24-Set e 22-Out e não se verificou nas amostras ambientais. Nestas mesmas amostras, também se verificou que as amplificações correspondentes ao gene *mcyE* e ao fragmento *Hep* apenas foram detectadas em alguns dos volumes. Contudo, as amplificações referentes ao gene *mcyE* e ao fragmento Hep em 22-Out e 24-Set, respectivamente, tinham sido detectadas nas amostras ambientais da lagoa da Vela e agora não foram detectadas em nenhum dos volumes amostrados nas mesmas datas.

Tabela 4 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nos volumes amostrados.

Local de Amostragem	**Mira**						**Vela**						
Data Amostragem	Mi 24-Set			Mi 22-Out			V 24-Set			V 22-Out			
Volume de amostragem (mL)	250	500	1000	100	250	1000	15	50	250	2	15	50	100
Fragmento amplificado													
16S rRNA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16S rRNA Microcystis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
mcyA	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✓
mcyB	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
mcyE	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
Hep	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
rpoC1 Cylindrospermopsis	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PKS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
PS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
AMT	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

✓ - Resultado positivo; ✗ **-** Resultado negativo.

Embora as cianobactérias potencialmente tóxicas tenham sido detectadas tanto nas amostras ambientais como nas amostras dos volumes correspondentes à mesma data de amostragem, a intensidade das bandas quando observadas em gel de agarose, diferem dependendo do volume (figura nº15 e 16). Nas amostras da lagoa da Vela é

perceptível que os volumes que apresentam melhores resultados para 24-Set são 50 e 250 mL e para 22-Out são 15; 50 e 100 mL. Nas amostras da lagoa de Mira para 24-Set todos os volumes apresentam uma banda de dimensão idêntica, no entanto, para 22-Out o volume maior, 1000 mL, parece ser o mais adequado.

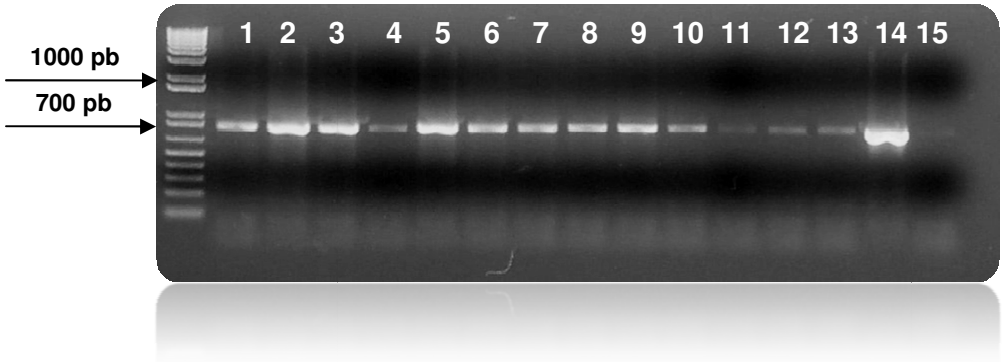


Figura nº 15 – Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.

O mesmo se verifica para as amostras da lagoa da Vela no gel de agarose correspondente à amplificação do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis.* Os volumes que apresentam melhores resultados para 24-Set são 50 e 250 mL e para 22-Out são 15; 50 e 100 mL.

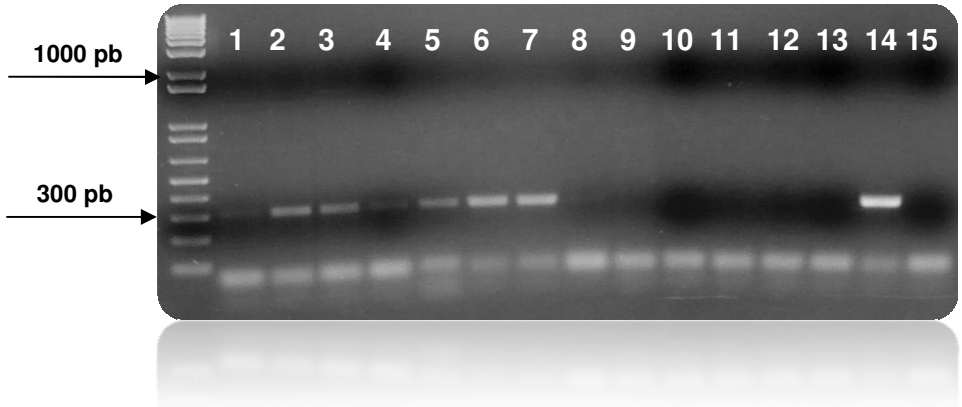


Figura nº 16 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene específico *rpoC1* de *Cylindrospermopsis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 300 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi

24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.

As restantes imagens em gel de agarose com os produtos de amplificação encontram-se no anexo 1.

3.3.2 – Identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR em tempo real

Nas figuras nº17 e 18 estão apresentados os resultados referentes à identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas, por PCR em tempo real, nas amostras dos volumes das lagoas de Mira e Vela. Na lagoa de Mira (figura nº17) a densidade de cianobactérias está na ordem de $1x10^3$ cel/mL. Tanto nas amostras dos volumes de 24-Set como de 22-Out *Microcystis* está em quantidades iguais ou inferiores à ordem de $1x10^1$ cel/mL. Em 24-Set no volume maior a mesma cianobactéria foi detectada mas não foi quantificada. No que concerne à quantificação do gene *mcyA*, esta apenas foi possível para os volumes menores de ambas as datas. Nos restantes volumes houve detecção mas não houve quantificação.

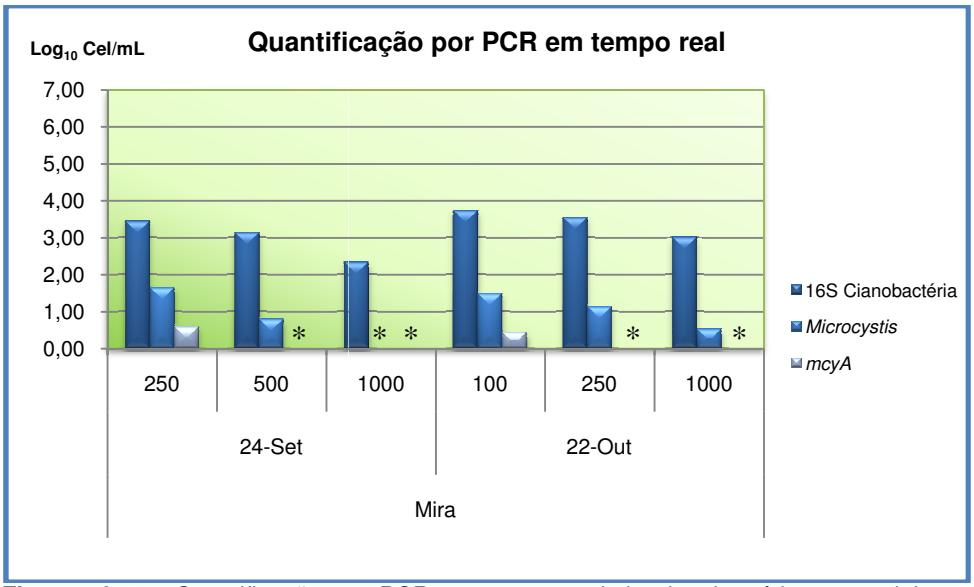


Figura nº 17– Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas, correspondentes às amostras dos volumes da lagoa de Mira. * - Detectado mas não quantificado.

No que respeita à lagoa da Vela (figura nº18) os volumes menores das duas datas de amostragem (24-Set: 15 e 50 mL; 22-Out: 2 e 15 mL) foram os que apresentaram maiores quantidades de cianobactérias, na ordem de $1x10^5$ cel/mL. Os volumes maiores (24-Set: 100 mL; 22-Out: 50 e 100 mL) apresentaram densidades celulares 10 vezes menores, na ordem de $1x10^4$ cel/mL. A quantidade de *Cylindrospermopsis* foi sempre superior à quantidade de *Microcystis,* tal como nas amostras ambientais. Na data de 24-Set para o volume de 15 mL observa-se uma diferença superior em relação aos restantes volumes (cerca de 100 vezes), uma vez que *Microcystis* foi apenas detectada. Na data de 22-Out a quantidade de *Cylindrospermopsis* também é relativamente superior à de *Microcystis* nos volumes de 2 e 50 mL. No volume de 2 mL é quando se verifica a quantidade máxima de *Cylindrospermopsis* e *Microcystis*, $2,95x10^3$ e $1,94x10^2$ cel/mL, respectivamente. Nos restantes volumes a diferença é residual. Por último o gene *mcyA* apenas não foi quantificado no volume de 50 mL em 24-Set. Nas restantes amostras das duas datas, os volumes menores apresentam quantidades superiores do gene *mcyA*, na ordem de $1x10^1$ cel/mL, enquanto os volumes maiores, apresentam quantidades inferiores à referida.

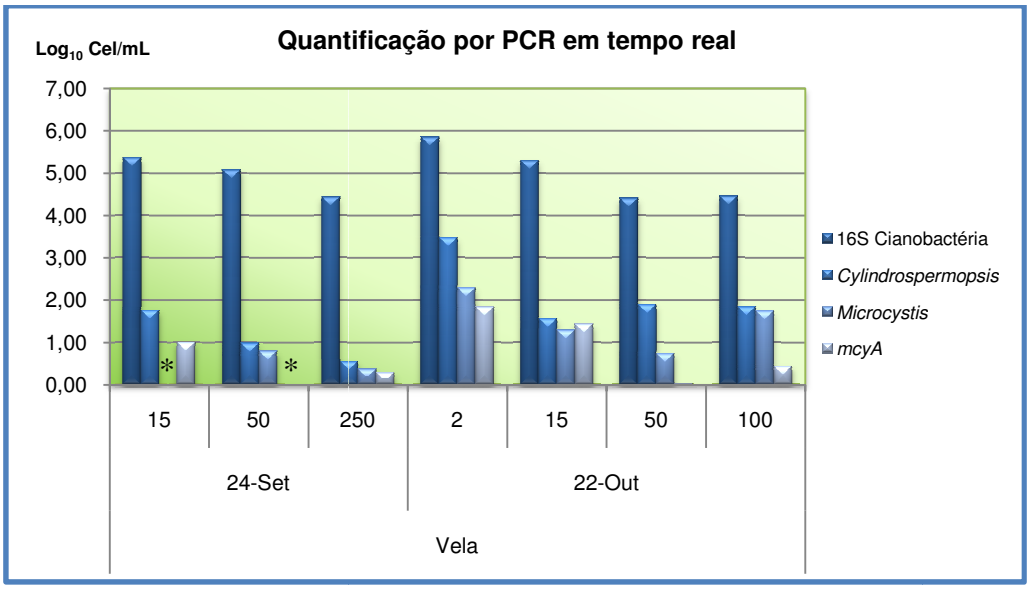


Figura nº 18– Quantificação por PCR em tempo real de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de toxinas, correspondentes às amostras dos volumes da lagoa da Vela. * – Detectado mas não quantificado.

3.3.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente e cilindrospermosina) por ELISA

Os resultados da quantificação da concentração de microcistina-LR equivalente e cilindrospermopsina nas amostras dos diferentes volumes apresentaram valores inferiores ao limite mínimo estabelecido (0,2 µg/L). Considera-se, portanto, que a concentração de microcistina-LR equivalente e cilindrospermopsina em todos os volumes analisados corresponde a zero µg/L.

3.4 – Cianobactérias isoladas nas lagoas de Mira e Vela e seu potencial tóxico

Com a elaboração deste trabalho foi possível isolar 30 estirpes de cianobactérias, algumas das quais reconhecidas pelo seu potencial tóxico. Das 30 estirpes isoladas, 11 são provenientes das amostras colhidas na lagoa de Mira e 19 são originárias das amostras colhidas na lagoa da Vela. Nas amostras das lagoas de Mira e Vela de 27-Ago por motivos de alteração do estado da água no dia da colheita, quase nunca foi permitido obter resultados em termos de isolamento.

3.4.1 – Identificação por microscopia e sequenciação molecular das culturas isoladas

Na lagoa de Mira observou-se uma grande diversidade de cianobactérias, nomeadamente, pertencentes à família *Oscillatoriales*. O género que se observou maioritariamente ao microscópio óptico foi o de *Leptolyngbya*.

As estirpes que foram isoladas em maior número correspondem aos géneros *Geitlerinema* e *Leptolyngbya,* tal como está apresentado na tabela nº6. No entanto, também se isolaram estirpes pertencentes ao género *Pseudoanabaena* e *Limnothrix.* Além destes géneros foram ainda visualizados outros ao microscópio óptico, como *Lyngbya* e *Oscillatoria*, contudo não foi possível o isolamento de nenhuma estirpe.

Tabela 5 – Géneros de cianobactérias identificadas ao microscópio óptico provenientes das amostras da lagoa de Mira.

Géneros identificados ao microscópio	Lagoa de Mira					
	26-Jun	30-Jul	13-Ago	27-Ago	24-Set	22-Out
Geitlerinema		✓	✓		✖	✓
Leptolyngbya	✓		✖	✖	✓	✓
Lyngbya		✖	✖		✖	✖
Oscillatoria					✖	
Pseudoanabaena	✖				✓	
Limnothrix					✓	

✓ - Género identificado ao microscópio, isolado e sequenciado; ✖ **-** Género identificado ao microscópio, mas não isolado nem sequenciado.

Na figura nº19 estão apresentadas imagens de géneros de cianobactérias isolados das amostras colhidas na lagoa de Mira.

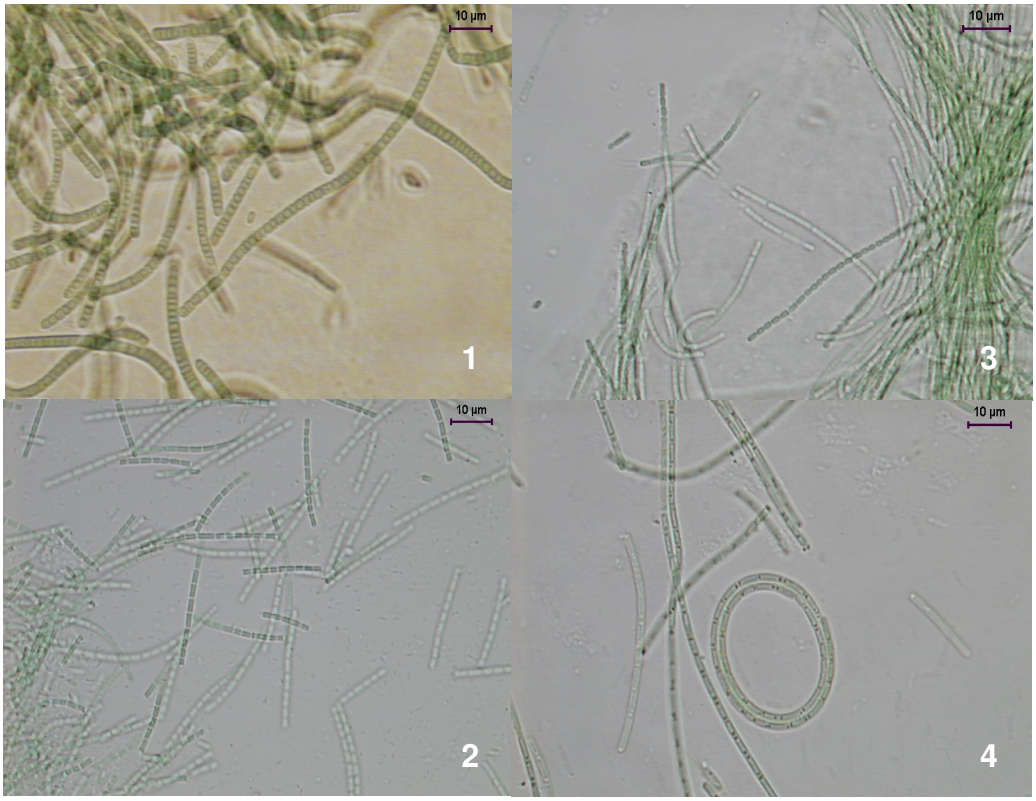


Figura nº 19 - Géneros de cianobactérias identificados, isolados e sequenciados molecularmente, provenientes das amostras colhidas na lagoa de Mira. (1) *Pseudoanabaena*; (2 e 3) *Leptolyngbya*; (4) *Limnothrix.*

A tabela nº7 corresponde aos resultados da sequenciação molecular do gene *16S rRNA* das culturas isoladas das amostras da lagoa de Mira. Apesar de se tratar de uma identificação genotípica, não se negligenciou a identificação fenotípica. Contudo, todas as estirpes pertenciam ao género identificado microscopicamente. Todas as espécies isoladas pertencem à família *Oscillatoriales*.

Tabela 6 – Resultados da sequenciação molecular do gene *16S rRNA* relativos às culturas isoladas das amostras colhidas na lagoa de Mira.

Amostra	Primers *16S* (pb) 27F/809R; 740F/1494R	Estirpe	% Similaridade	Código Acesso
Mi 26-Jun	1447	***Leptolyngbya sp**. CENA104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	100%	EF088333.1
Mi 26-Jun	1380	***Leptolyngbya sp**. 0BB32S02 partial 16S rRNA gene,strain 0BB32S02*	99%	AJ639894.1
Mi 26-Jun	1404	***Leptolyngbya boryana** UTEX 'B 485' small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	AF132793.1
Mi 30-Jul	704	***Geitlerinema carotinosum** AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile e tRNA-Ala genes, complete sequence; e 23S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	AY423710.1
Mi 13-Ago	463	***Geitlerinema carotinosum** AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile e tRNA-Ala genes, complete sequence;e 23S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	AY423710.1
Mi 24-Set	707	***Leptolyngbya frigida** ANT.LH8.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	100%	AY493610.1
Mi 24-Set	1375	***Pseudanabaena tremula** UTCC 471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	96%	AF218371.1
Mi 24-Set	1415	***Limnothrix redekei** 165c partial 16S rRNA gene, strain 165c*	99%	AJ505943.1
Mi 22-Out	1381	***Geitlerinema carotinosum** AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile e tRNA-Ala genes, complete sequence; e 23S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	AY423710.1
Mi 22-Out	756	***Geitlerinema lemmermannii** 0513 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU072718.1
Mi 22-Out	725	***Leptolyngbya sp**. FB1-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	97%	EU586742.1

Na lagoa da Vela foram visualizadas ao microscópio óptico cianobactérias pertencentes à ordem *Nostocales*, família *Nostocaceae* e à família *Oscillatoriales*. As espécies de cianobactérias mais comuns, visualizadas ao microscópio óptico na lagoa da Vela, especialmente nas datas de 24-Set e 22-Out, foram a *Aphanizomenon aphanizomenoides* e a *Cylindrospermopsis raciborskii*, respectivamente. No entanto, observaram-se e isolaram-se outros géneros, apresentados na tabela nº8. O género isolado em mais datas foi o de *Leptolyngbya*.

Tabela 7 – Géneros/espécie de cianobactérias identificadas ao microscópio óptico provenientes das amostras da lagoa da Vela.

Géneros/espécie identificados ao microscópio óptico	**Lagoa da Vela**					
	26-Jun	**30-Jul**	**13-Ago**	**27-Ago**	**24-Set**	**22-Out**
Anabaena	✖	✓				✓
Aphanizomenon		✖			✓	✖
Cylindrospermpsis raciborskii	✖	✖			✖	✓
Geitlerinema	✓				✓	✓
Leptolyngbya	✓	✓	✓	✖	✓	✓
Lyngbya					✖	
Pseudoanabaena	✓					
Oscillatoria					✖	✖
Phormidium					✓	✖
Limnothrix					✓	

✓ - Género identificado ao microscópio, isolado e sequenciado; ✖ **-** Género identificado ao microscópio, mas não isolado nem sequenciado.

Na figura nº20 estão apresentadas imagens de géneros e espécies isolados das amostras colhidas na lagoa da Vela. Destaca-se nesta figura o número 3, pois trata-se inequivocamente de *Cylindrospermopsis raciborskii*, pela presença do heterocisto terminal, característico desta espécie.

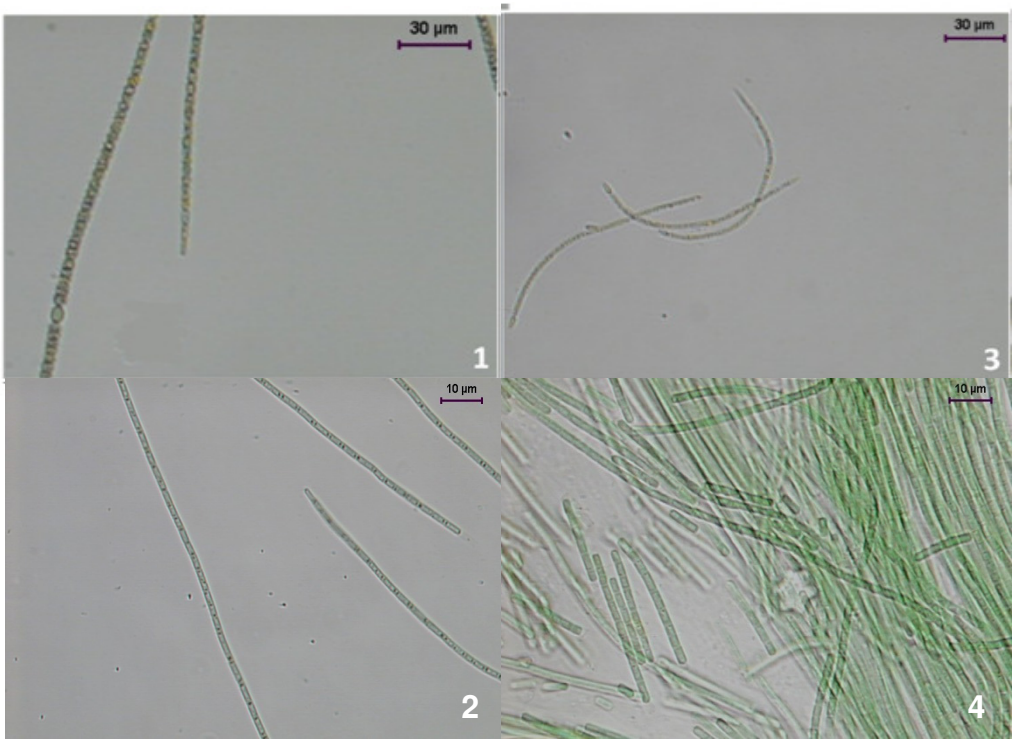


Figura nº 20 – Espécies/Géneros identificados, isolados e sequenciados molecularmente, provenientes das amostras colhidas na lagoa da Vela. (1) *Aphanizomenon aphanizomenoides*; (2) *Geitlerinema*; (3) *Cylindrospermopsis raciborskii*; (4) *Leptolyngbya*.

Os resultados expressos na tabela nº 9 dizem respeito à sequenciação molecular do gene *16S rRNA* das culturas isoladas das amostras da lagoa da Vela. Quatro das estirpes pertencem à ordem *Nostocales*, família *Nostocaceae* e as restantes pertencem à família *Oscillatoriales*. A grande maioria das estirpes pertencia ao género identificado ao microscópio óptico.

Tabela 8 - Resultados da sequenciação molecular do gene *16S rRNA* relativos às culturas isoladas das amostras colhidas na lagoa da Vela.

Amostra	Primers 16S (pb) 27F/809R; 740F/1494R	Estirpe	% Similaridade	Código Acesso
V 26-Jun	1420	***Pseudanabaenaceae cyanobacterium*** *HTT-U-KK3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	96%	EF654069.1
V 26-Jun	1404	***Leptolyngbya sp.*** *CENA104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	100%	EF088333.1
V 26-Jun	757	***Geitlerinema amphibium*** *0519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU068740.1
V 26-Jun	1493	***Leptolyngbya sp.*** *PCC 73110 small subunit ribosomal RNA gene*	100%	AF132785.1
V 30-Jul	1385	***Leptolyngbya sp****. 0BB32S02 partial 16S rRNA gene, strain 0BB32S02*	99%	AJ639894.1
V 30-Jul	1369	***Anabaena sp.*** *LMECYA 185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU078546.1
V 30-Jul	724	***Leptolyngbya sp.*** *CR_17M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	98%	EF545607.1
V 13-Ago	750	***Leptolyngbya sp.*** *0BB32S02 partial 16S rRNA gene, strain 0BB32S02*	99%	AJ639894.1
V 13- Ago	759	***Leptolyngbya sp.*** *N62DM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	98%	FJ410906.1
V 24-Set	761	***Geitlerinema amphibium*** *0519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	98%	EU068740.1
V 24-Set	1376	***Leptolyngbya sp.*** *PCC 73110 gene for 16S rRNA, partial sequence*	100%	AB075988.1
V 24-Set	1341	***Phormidium sp.*** *MBIC10025 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: MBIC10025*	98%	AB183566.1
V 24-Set	1214	***Limnothrix redekei*** *LMECYA 145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	100%	EU078512.1
V 24-Set	499	***Aphanizomenon aphanizomenoides*** *UADFA8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	FJ895122.1
V 22-Out	1336	***Anabaena sp.*** *LMECYA 185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU078546.1
V 22-Out	746	***Geitlerinema amphibium*** *0519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU068740.1
V 22-Out	735	***Anabaena sp.*** *LMECYA 185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%	EU078546.1
V 22-Out	725	***Leptolyngbya frigida*** *ANT.LH53B.2 16S*	95%	AY493576.1

		ribosomal RNA gene, partial		
V 22-Out	1388	***Cylindrospermopsis raciborskii*** *strain 4799 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	100%	AF516741.1

3.4.2 – Identificação de genes responsáveis pela biossíntese de toxinas por PCR convencional

Nas tabelas nº10 e 11 estão expostos os resultados referentes à análise molecular de genes implicados na biossíntese de cianotoxinas nas amostras das culturas isoladas. Para ambas as lagoas se confirma que todas as culturas isoladas são efectivamente cianobactérias, pela amplificação do gene *16S rRNA*.

Tabela 9 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas culturas isoladas da lagoa de Mira.

Local de Amostragem	**Lagoa de Mira**										
Data Amostragem	26-Jun			30-Jul	13-Ago	24-Set			22-Out		
Espécie isolada	*Leptolyngbya sp.*	*Leptolyngbya sp.*	*Leptolyngbya boryana*	*Geitlerinema carotinosum*	*Geitlerinema carotinosum*	*Leptolyngbya frigida*	*Pseudanabaena tremula*	*Limnothrix redekei*	*Geitlerinema carotinosum*	*Geitlerinema lemmermannii*	*Leptolyngbya sp.*
Fragmento amplificado											
16S rRNA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
mcyA	✓	✓	✖	✓	✖	✓	✖	✖	✖	✖	✖
mcyE	✓	✓	✖	✓	✓	✖	✖	✖	✖	✖	✖
Hep	✖	✖	✖	✖	✖	✓	✖	✖	✖	✖	✖
PKS	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
PS	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
AMT	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖

✓ - Resultado positivo; ✖ **-** Resultado negativo.

Apesar dos genes *mcyA* e *mcyE* serem conhecidos como estando presentes em espécies produtoras de microcistina pertencentes aos géneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*, estes também foram detectados em algumas das estirpes isoladas nas lagoas de Mira e Vela que não pertencem aos géneros referidos (tabela nº10 e 11). Além disso também foi amplificado o fragmento com os *primers Hep*, cuja presença pode indicar a síntese de microcistina/nodularina. Na lagoa de Mira as estirpes em que se obteve os resultados positivos, supracitados, pertencem aos géneros *Leptolyngbya* e *Geitlerinema*.

Tabela 10 - Resultados da amplificação por PCR convencional de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas nas culturas isoladas das amostras da lagoa da Vela.

Local de Amostragem	Lagoa da Vela																		
Data Amostragem	26-Jun				30-Jul			13-Ago		24-Set					22-Out				
Espécie isolada	*Pseudanabaenaceae cyanobacterium*	*Leptolyngbya sp.*	*Geitlerinema amphibium*	*Leptolyngbya sp.*	*Leptolyngbya sp.*	*Anabaena sp.*	*Leptolyngbya sp.*	*Leptolyngbya sp.*	*Leptolyngbya sp.*	*Geitlerinema amphibium*	*Leptolyngbya sp.*	*Phormidium sp.*	*Limnothrix redekei*	*Aphanizomenon aphanizomenoides*	*Anabaena sp.*	*Geitlerinema amphibium*	*Anabaena sp.*	*Leptolyngbya frigida*	*Cylindrospermopsis raciborskii*
Fragmento amplificado																			
16S rRNA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
mcyA	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓
mcyE	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓
Hep	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
PKS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
PS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
AMT	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

✓ - Resultado positivo; ✗ **-** Resultado negativo.

Na lagoa da Vela as estirpes em que se obteve os resultados positivos, supracitados, correspondem aos géneros *Leptolyngbya*, *Geitlerinema*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*.

As imagens em gel de agarose correspondentes aos produtos de PCR amplificados encontram-se no anexo 1.

3.4.3 – Quantificação de toxina (microcistina-LR equivalente) por ELISA

O imunoensaio ELISA foi efectuado para as cianobactérias isoladas em que houve resultados positivos para a presença de genes responsáveis pela biossíntese de microcistina.

Todos os resultados, relativos à concentração de microcistina-LR equivalente foram inferiores ao limite mínimo estabelecido (0,2 µg/L). A concentração da toxina nas cianobactérias isoladas foi, por isso, considerada zero µg/L.

3.4.4 – Detecção de toxinas (microcistinas) por MALDI-TOF MS

Esta técnica foi aplicada para caracterizar a gama de compostos potencialmente tóxicos presentes nas cianobactérias isoladas que possuíam genes responsáveis pela biossíntese de microcistinas.

Em nenhuma das amostras das culturas isoladas foram encontradas moleculas cuja massa correspondesse à de microcistina-LR (995,6 *m/z*) ou outras variantes de microcistina. Na maioria das culturas foram detectados picos de moleculas cuja massa variava na gama dos 500 a 900 *m/z*, os quais não têm identificação conhecida.

Contudo, tal como está apresentado na figura nº21, a espécie *Leptolyngbya frígida* (Mi 24-Set) apresentou um pico de aproximadamente 62% de intensidade com massa de 996,42 *m/z*, muita próxima da que corresponde à de microcistina-LR (995,6 *m/z*).

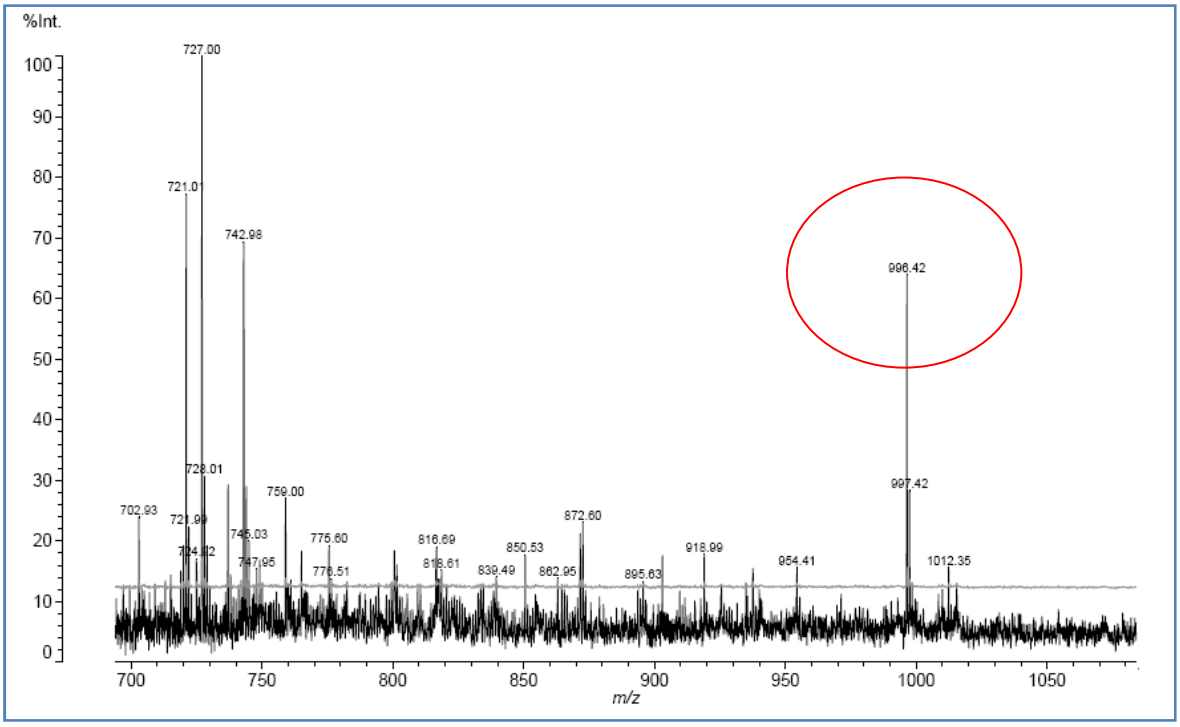


Figura nº 21 – Espectro de massa de MALDI-TOF MS para a espécie *Leptolyngbya frígida* isolada na amostra de 24-Set da lagoa de Mira.

4 - Discussão dos Resultados

4.1 – Análise físico-química

Na lagoa de Mira, em todas as datas de amostragem foram detectadas e quantificadas pelos métodos moleculares cianobactérias, inclusive *Microcystis*, o que indica que as condições físico-químicas eram no mínimo adequadas para a sua existência. A variação dos factores físicos e químicos da água, resulta em grandes flutuações nos níveis de cianobactérias e das suas toxinas (Vasconcelos 1993). Os blooms de cianobactérias persistem nos reservatórios de água que contém níveis adequados de nutrientes inorgânicos essenciais, tais como azoto e fósforo (Gonçalves *et al.* 1996). A temperatura e pH óptimos de crescimento estão geralmente entre os 15 e 30ºC e os 6 e 9, respectivamente (Vale 2005). Na lagoa de Mira a temperatura encontra-se dentro do intervalo referido, no entanto, nunca foi superior a 25ºC, chegando a atingir os 16ºC na última data de amostragem. Em relação ao oxigénio dissolvido na lagoa de Mira, desde as primeiras datas de amostragem para a última data de amostragem observou-se uma subida da sua concentração de quase 4 mg/L. O oxigénio dissolvido é essencial para a manutenção das comunidades aeróbias e para os processos de degradação da matéria orgânica. Este parâmetro pode, no entanto, sofrer quebras significativas na presença de: grandes quantidades de matéria orgânica (resultantes da descarga de efluentes urbanos), florescências de algas ou macrófitas em decomposição (Vale 2005). Relacionando o aumento deste parâmetro com a diminuição da temperatura, podemos inferir que as condições físico-químicas podem ter sido a causa de uma descida da densidade de cianobactérias na última data de amostragem, valor obtido por PCR em tempo real. No que diz respeito à condutividade na lagoa de Mira, esta foi aumentando ligeiramente ao longo das amostragens. Vale (2005) refere que aumentos bruscos de condutividade podem ter impacto nas densidades de fitoplâncton, uma vez que originam fenómenos de difusão da parede celular que podem provocar lise. Quando ocorre lise das células das cianobactérias, por morte celular ou por ruptura (tratamento químico/físico, por exemplo), as toxinas são libertadas para a água, podendo surgir nos locais elevadas quantidades de toxinas (Lindner *et al.* 2004). Os parâmetros ambientais parecem também afectar a produção de toxinas. Na lagoa de Mira, por ELISA, foi quantificada uma baixa concentração de microcistina-LR equivalente (<1µg/L) (figura nº13), o que sugere que a quantidade de cianobactérias potencialmente tóxicas na lagoa de Mira era relativamente baixa, ou que talvez os parâmetros físico-químicos da água não fossem os mais adequados para a produção das cianotoxinas pelas cianobactérias presentes. É possível que durante o período em que as estirpes sejam colhidas não haja

produção de toxinas, devido ao facto de as concentrações de nutrientes, temperatura, intensidade luminosa ou outros factores não serem os mais apropriados (Vasconcelos 1995; Vasconcelos *et al.* 1993), ou as estirpes predominantes não produzem toxinas. A toxicidade de uma florescência pode variar bastante numa massa de água, quer com o tempo, quer com o local de colheita. A produção de toxina por *Microcystis* é dependente da temperatura, luz e nutrientes (Vasconcelos 1994).

No que concerne à variação dos parâmetros físico-químicos da água da lagoa da Vela, estes podem estar relacionados com a presença de maiores quantidades de cianobactérias e cianotoxinas. Tanto a temperatura como o pH correspondiam aos valores óptimos de crescimento de cianobactérias, registando-se valores mais elevados do que o se obteve na lagoa de Mira. Em situações de dominância de cianobactérias, especialmente durante florescências, encontram-se valores elevados de pH (Vale 2005). Na lagoa da Vela, por PCR em tempo real, foram quantificadas elevadas concentrações de cianobactérias, na ordem de $1x10^7$ cel/mL (figura nº12). Os blooms de cianobactérias são comuns em lagoas de água doce onde a temperatura, a carga de nutrientes e a estagnação da água são geralmente altas (Saker and Eaglesham 1999). *Cylindrospermopsis* estava em elevada concentração. Nas últimas duas amostragens representa quase a totalidade de cianobactérias. Blooms da espécie de *Cylindrospermopsis raciborskii* têm sido reportados durante os meses mais quentes do ano, a partir de Julho até Outubro, nomeadamente em locais onde a temperatura das águas superficiais são superiores a 20ºC (Saker *et al.* 2003). Altas temperaturas e elevados valores de pH parecem favorecer o crescimento de cianobactérias, nomeadamente de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Saker and Eaglesham 1999). Em estudos efectuados na lagoa da Vela por Abrantes *et al* (2006), a variação da temperatura foi de aproximadamente 10ºC dos meses de Verão (Junho a Agosto, 29ºC), para os meses de Outono, (19ºC). Estes valores de temperatura são concordantes com os deste estudo, cuja temperatura variou cerca de 10ºC entre as primeiras amostragens (28,5ºC) (meses de Verão) e a última amostragem (19ºC) (Outono). Geralmente com o declínio da temperatura associa-se a redução da quantidade das cianobactérias (Abrantes *et al.* 2006). De facto isso não foi verificado neste estudo, pois na última amostragem (Outubro) registou-se, por PCR em tempo real, elevadas quantidades de cianobactérias ($1x10^7$ cel/mL) e a maior densidade celular de *Cylindrospermopsis*. No entanto, por este método nada é conhecido sobre a viabilidade celular.

Microcystis esteve sempre presente na lagoa da Vela, contudo, na última data de amostragem, por PCR em tempo real, foi apenas detectada e não quantificada, o que sugere que a sua concentração diminuiu. Nessa mesma data verificou-se uma ligeira diminuição do pH e um aumento da condutividade, sugerindo que pode ter havido morte

celular. Também Vale (2005) verificou com o aumento da condutividade uma queda da densidade de fitoplâncton em estudos que efectuou em reservatórios de água.

A concentração total de toxinas parece estar relacionada com a radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e oxigénio dissolvido (Vasconcelos 1993). A temperatura óptima de produção de toxina pelas cianobactérias está entre os 20 e 25ºC, sugerindo que as cianobactérias são muito mais tóxicas durante os períodos mais quentes. Na lagoa da Vela observaram-se elevadas concentrações de microcistina nas datas de 13-Ago e 24-Set. Embora nas respectivas datas a temperatura tivesse diminuído em relação às datas de amostragem anteriores, ainda se encontrava próxima dos 25ºC. A 24-Set observou-se um acréscimo da concentração de oxigénio em relação às outras datas de amostragem, que pode ser indicativo da intensa actividade fotossintética, por parte da massa cianobacteriana. Apesar de existir uma elevada quantidade de *Cylindrospermopsis*, a toxina característica desta cianobactéria (cilindrospermopsina) não foi detectada. Estudos efectuados em relação à influência da temperatura na produção de cilindrospermopsina, demonstram que, as concentrações máximas de cilindrospermopsina foram observadas em culturas que cresceram a 20ºC (Griffiths and Saker 2003), uma temperatura muito abaixo da temperatura óptima de crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

4.2 – Comparação de métodos de monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas em amostras ambientais

As técnicas moleculares aplicadas neste estudo, o PCR convencional e o PCR em tempo real, mostraram-se efectivos para a detecção de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas (tabela nº4 e figuras 11 e 12). Contudo, o PCR em tempo real mostrou-se mais eficiente e permitiu ter uma maior percepção do estado de contaminação da água em relação à concentração das cianobactérias potencialmente tóxicas presentes, pelo que, pode ser uma ferramenta alternativa como método de monitorização de cianobactérias pelas entidades responsáveis pela gestão da água.

Em todas as amostras foi amplificado com êxito o gene *16S rRNA*, indicando a presença de cianobactérias nas amostras. *Cylindrospermopsis* foi detectada e quantificada em todas as amostras da lagoa da Vela por PCR convencional e por PCR em tempo real, respectivamente. Nas amostras ambientais da lagoa da Vela as densidades celulares de cianobactérias atingiram em todas as datas de amostragem

aproximadamente a ordem de $1x10^8$ cel/mL. *Cylindrospermopsis* foi a cianobactéria potencialmente tóxica que dominou na lagoa da Vela, estando presente em densidades na ordem de $1x10^6$ cel/mL, nas primeiras datas de amostragem, atingindo quase a ordem de $1x10^8$ cel/mL na última data de amostragem. Outros autores já reportaram a presença desta cianobactéria em Portugal. Em águas doces Portuguesas *Cylindrospermopsis raciborskii* foi detectada em densidades celulares superiores a $3x10^6$ cel/mL (Saker *et al.* 2003).

Microcystis foi detectada e quantificada em todas as amostras das duas lagoas por PCR convencional e por PCR em tempo real, respectivamente, com a excepção da quantificação da amostra de 22-Out da lagoa da Vela. Este resultado ocorreu devido à formação de picos de dímeros com uma intensidade de fluorescência idêntica à do pico da temperatura de *Melting.* Isto deve-se, provavelmente, à baixa densidade celular da cianobactéria presente na amostra. Os resultados de PCR em tempo real dependem da quantidade e qualidade do DNA molde e da optimização do ensaio (Nolan *et al.* 2006). A optimização da concentração de *primers* pode melhorar significativamente a sensibilidade do ensaio (Nolan *et al.* 2006). Para tentar evitar a formação de dímeros, a concentração de *primers* para cada reacção foi reduzida para metade, no entanto, mesmo com esta medida foi inevitável a sua formação. Na lagoa de Mira *Microcystis* apenas dominou na primeira data de amostragem com uma densidade celular na ordem de $1x10^3$ cel/mL, nas datas posteriores esteve sempre presente, no entanto, em quantidades aproximadamente 100 vezes inferiores. Os resultados sugerem que a quantidade de *Microcystis* pode variar bastante num curto espaço de tempo. A flutuação da densidade de cianobactérias em blooms, assim como a variação de espécies dominantes ocorrem com muita frequência na lagoa de Mira (Vasconcelos 1994). Densidades celulares superiores de *Microcystis* foram já encontradas nesta lagoa. Vasconcelos (1994) em estudos que efectuou na lagoa de Mira, encontrou densidades celulares de cianobactérias na ordem dos $6,6x10^7$ cel/mL. *Microcystis aeruginosa* atingiu os $3,8x10^6$ cel/mL (Vasconcelos 1994). Na amostra de 26-Jun a quantificação, em células equivalentes, do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* foi superior à do gene *16S rRNA* de cianobactéria. Resultados idênticos já foram reportados por outros autores. Rinta-Kanto *et al* (2005) refere que numa reacção de PCR em tempo real o número de cópias do gene por célula pode variar de uma até mais de quatro. Esta variação, deve portanto ser considerada, devendo ser feita uma estimativa do número de cópias, para evitar fontes de erro (Rinta-Kanto *et al.* 2005). Outro factor que pode ter influênciado este resultado corresponde a erros na quantificação das células do controlo (M6) que foi utilizado para a elaboração da curva padrão.

Realça-se, no entanto, que *Microcystis* não foi observada através do microscópio óptico em nenhuma das amostras. Esta situação pode estar relacionada com as limitações da técnica, pois o volume observado ao microscópio óptico é muito inferior ao que é utilizado para as técnicas moleculares, em que a amostra é concentrada num filtro. Portanto, em termos probabilísticos se a concentração de cianobactérias for baixa, e uma vez que estes organismos não se encontram distribuídos homogeneamente nas massas de água, podem não ser detectados por microscopia. A técnica microscópica não parece, por isso, ser adequada para a detecção de cianobactérias que estejam em baixas concentrações nas massas de água. Resultados idênticos foram obtidos por Saker *et al* (2007a), quando *Microcystis* não era dominante nas amostras ambientais, não a detectou por microscopia, mas por PCR convencional detectou a sua presença. As técnicas moleculares mostram portanto, um nível elevado de especificidade e sensibilidade na detecção de cianobactérias nas amostras ambientais. O PCR convencional é reportado por outros autores como uma técnica bastante sensível na detecção de cianobactérias. Baker *et al* (2002) refere que apenas 10 cel/mL são suficientes para haver detecção por PCR convencional. As técnicas moleculares poderão substituir as técnicas microscópicas, caracterizadas como trabalhosas e morosas. Inclusive podem ser utilizadas como uma forma de prevenção, pelo que permitem a deteção de cianobactérias potencialmente tóxicas antes dos blooms ocorrerem.

Não obstante, em relação à detecção de genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas, na lagoa da Vela, foi detectada por PCR convencional, a presença de um gene implicado na biossíntese de microcistina (*mcyE*) nas amostras de 13-Ago, 24-Set e 22-Out. Nas mesmas datas foi também amplificado o fragmento com os *primers Hep*, que indicía a presença de microcistina e/ou nodularina. A detecção e quantificação de genótipos de cianobactérias tóxicas *versus* não tóxicas foram por muito tempo impedidas, pelo facto de não ser possível a diferenciação morfológica ao microscópio óptico. O PCR parece ser uma ferramenta extremamente útil para a detecção de *clusters* de genes que codificam a síntese de cianotoxinas. A amplificação com *primers* específicos das sequências do *cluster* do gene *mcy*, permite descriminar estirpes potencialmente produtoras de microcistina das não produtoras (Ouahid 2008; Vasconcelos 2006). Estudos realizados com PCR em tempo real, em amostras de lagos, revelam que parece haver uma correlação positiva entre a concentração de microcistina e a soma de cópias do gene *mcyE* quantificadas para *Microcystis* e *Anabaena* (Saker *et al*. 2005b; Vaitomaa *et al.* 2003), sugerindo que esta técnica pode ser utilizada como substituta da quantificação da concentração de microcistina de *Microcystis* e *Anabaena*. No entanto, segundo os mesmos autores esta correlação positiva nem sempre é verificada. Além disso, a concentração de microcistina pode variar significativamente entre as estirpes

produtoras (Vaitomaa *et al.* 2003), independentemente da quantidade de cianobactérias presentes. A quantificação da concentração das toxinas parece portanto ser imprescindível, contudo esta não pode ser assegurada pelas técnicas moleculares.

Os resultados obtidos por ELISA para a quantificação de microcistina-LR equivalente (figura nº13) são concordantes com as densidades celulares de *Microcystis* quantificadas por PCR em tempo real na lagoa da Vela, pois os picos de toxina foram obtidos quando em termos quantitativos havia maior abundância desta cianobactéria (13-Ago e 24-Set). Em relação ao PCR convencional também nestas datas foi detectada a presença do gene *mcyE* e a amplificação do fragmento com os *primers Hep*, demonstrando que os dados são coerentes. Na última data de amostragem na lagoa da Vela (22-Out) também se verifica a presença do gene *mcyE* e a amplificação do fragmento com os *primers Hep*, no entanto, a quantidade de microcistina-LR equivalente diminuiu substancialmente. Saker *et al* (2007a) em estudos que efectuou sobre a detecção de genes *mcy* e posterior comparação com ELISA, obteve amostras em que foi detectada a presença do gene *mcyA*, no entanto, não detectou qualquer concentração da toxina por ELISA. A presença de genes *mcy* não indica necessariamente a presença de microcistina (Saker *et al.* 2007a). Além disso, o facto do resultado ser positivo em termos de PCR nada nos informa sobre a viabilidade das células. Após a fase de morte resulta a lise celular, podendo, ainda ficar na água DNA genómico de blooms anteriores (Saker *et al.* 2007a). Não obstante, na lagoa da Vela em 22-Out, *Microcystis* foi apenas detectada e não quantificada por PCR em tempo real, sugerindo que estava em quantidades muito reduzidas. Apesar da concentração de microcistina-LR equivalente ter diminuído bastante em relação às datas anteriores, ainda se apresentou superior a 1µg/L nas amostras tratadas. De facto, o conteúdo em microcistina pode não estar relacionado com a biomassa de *Microcystis* produtora da toxina (Saker *et al.* 2007a). Contudo, isto também pode sugerir que nestas amostras *Microcystis* pode não ser a única cianobactéria produtora de microcistina. Inclusive, o gene *mcyB*, descrito como específico pela produção de microcistina por *Microcystis* (Nonneman and Zimba 2002) não mostrou resultados positivos por PCR convencional.

Na lagoa de Mira, também foi possível quantificar microcistina-LR equivalente, porém, por PCR convencional não foi amplificado qualquer gene implicado na biossíntese de microcistina (*mcyA, mcyB* e *mcyE*) nem o fragmento com o par de *pimers Hep*. No estudo efectuado por Saker *et al.* (2007a), em algumas das suas amostras também não foram detectados genes *mcy*, e, no entanto, foi quantificada por ELISA microcistina-LR equivalente. A via biossintética para a produção de microcistina foi recentemente elucidada. As microcistinas são sintetizadas pelos complexos enzimáticos NRPS (Non-ribosomal peptide synthethase) e PKS (polyketide synthase) que são codificados pelo

cluster de genes *mcy* (Furukawa *et al.* 2006; Pearson and Neilan 2008). Os módulos NRPS e PKS contêm os genes *mcyA, mcyB, mcyC, mcyD, mcyE, mcyF*, *mcyG, mcyH, mcyI e mcyJ* (Neilan *et al.* 1997; Ouahid 2008). Ouahid (2008) refere que amplificar um pequeno número de genes *mcy* não é suficiente para efectuar o diagnóstico completo do potencial tóxico de *Microcystis* (Ouahid 2008). Portanto, para uma avaliação mais completa do potencial tóxico das cianobactérias nas amostras, deve ser pesquisado um maior número de genes implicados na biossíntese de microcistina. Aliás, além de microcistinas, as cianobactérias podem produzir um elevado número de oligopéptideos que são presumivelmente sintetizados pela via biossintética NRPS (Welker *et al.* 2006).

Na lagoa da Vela, os resultados obtidos por ELISA para a quantificação da concentração de cilindrospermopsina estão concordantes com o que foi obtido por PCR convencional para os genes implicados na biossíntese desta toxina (PS e PKS), pois nenhum deles foi amplificado. Valério *et al* (2005) obteve resultados idênticos em estirpes de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas em Portugal, cuja amplificação dos genes PS e PKS foi negativa, sendo confirmada a ausência de cilindrospermopsina por HPLC. Também Saker *et al* (2003) em estudos que efectuou com *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada em Portugal reporta a ausência de cilindrospermopsina. Este estudo permite continuar a confirmar que as estirpes Portuguesas de *Cylindrospermopsis raciborskii* não são produtoras de cilindrospermopsina. Nem todas as estirpes de *Cylindrospermopsis raciborskii* produzem cilindrospermopsina (Fergusson and Saint 2003). O mecanismo proposto da biossíntese de cilindrospermopsina sugere que tem uma origem PKS e PS, no entanto, os genes responsáveis pela produção da toxina não foram completamente elucidados (Rasmussen *et al.* 2007). O ensaio de PCR em tempo real para a detecção de *Cylindrospermopsis* e cilindrospermopsina com o gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* e os genes *aoaA, aoaB* e *aoaC*, respectivamente, mostrou ser bastante sensível e rápido, podendo ser utilizado para monitorização de amostras de campo (Rasmussen *et al.* 2007). Cilindrospermopsina foi monitorizada por PCR em tempo real com os genes *aoaA, aoaB* e *aoaC*, e os resultados provaram que estes genes estão envolvidos na produção da toxina (Rasmussen *et al.* 2007).

Ainda no que concerne aos resultados obtidos por ELISA na lagoa da Vela, o tratamento das amostras parece ser imprescindível para não subestimar a concentração de toxina. Tal como se pode observar na figura nº13, os valores de concentração variam substancialmente da amostra ambiental para a amostra tratada. Em 24-Set a variação é de aproximadamente 6 µg/L. Nas amostras da lagoa de Mira isso não se verifica, pois existem amostras ambientais com uma concentração mais elevada de microcistina-LR equivalente do que as respectivas amostras tratadas. Provavelmente tudo depende das

estirpes de cianobactérias presentes em cada uma das lagoas, no que respeita à manutenção da toxina no meio intracelular ou extracelular. Outro factor que pode estar na origem destes resultados é o facto da toxina quantificada não pertencer às cianobactérias presentes, mas já existir na massa de água de blooms anteriores.

Em quatro das datas de amostragem na lagoa da Vela (30-Jul, 13-Ago, 24-Set e 22-Out), o valor limite imposto pela legislação Portuguesa para microcistina-LR em águas de consumo (1 µg/L) foi ultrapassado. Este resultado não é surpreendente, microcistina já foi quantificada por ELISA em lagoas Portuguesas em valores de 34,7 µg/L (Vasconcelos 1999). No entanto, os resultados de confirmação por HPLC não estão de acordo com as concentrações que foram obtidas por ELISA, pois em nenhuma das amostras foi detectada microcistina-LR, nem outra variante de microcistina. Embora nos cromatogramas, tivessem sido observados picos no mesmo tempo de retenção da toxina, os espectros de absorvância a 238 nm não correspondiam. Não obstante, poderíamos estar perante uma variante de microcistina com um espectro de absorvância diferente. A maioria das microcistinas e nodularina têm um máximo de absorvância UV de 238 nm. No entanto, microcistinas com constituintes aromáticos nos aminoácidos, como microcistina-LW que contém triptofano, tem uma absorvância máxima a um comprimento de onda mais baixo, correspondente a 222 nm (Msagati *et al.* 2006). Todavia, o limite de detecção do HPLC (0,1µg/mL) é 1000 vezes inferior ao limite de detecção de ELISA (0,1µg/L), mostrando-se esta última técnica mais sensível do que a primeira, o que pode explicar o resultado. Metcalf *et al.* (1999) em estudos que efectuou, obteve maior número de resultados positivos para amostras analisadas por ELISA do que por HPLC, referindo que este resultado não era inesperado pelas diferenças de sensibilidade das técnicas. A detecção por ELISA é cumulativa, permitindo uma potencial reactividade cruzada entre as imunoglobulinas com todas as variantes de microcistina, enquanto, por HPLC cada toxina é detectada individualmente (Metcalf *et al.* 1999). Segundo o mesmo autor as amostras que foram positivas para ELISA e negativas para HPLC correspondiam a estirpes de *Aphanizomenon, Anabaena* e *Phormidium* (Metcalf *et al.* 1999). Isto sugere que a microcistina detectada por ELISA neste trabalho possa pertencer a uma variante diferente, provavelmente por ser produzida por outra espécie de cianobactéria que não *Microcystis*.

De uma forma geral, os métodos moleculares mostraram-se concordantes com o método imunológico nas amostras da lagoa da Vela. Também Saker *et al* (2005) em estudos que efectuou com PCR convencional para determinar o agente causal da produção de microcistina em suplementos alimentares, concluiu que se as técnicas moleculares forem combinadas com outras técnicas químicas e bioquímicas, tais como

HPLC e ELISA, pode ser possível monitorizar de forma rápida, sensível e inequívoca a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas.

As lagoas de Mira e Vela são geralmente utilizadas para fins recreativos e para pesca desportiva. Face aos resultados obtidos por ELISA verifica-se que os utilizadores poderão estar expostos a concentrações significativas de microcistina. Não obstante, a densidade celular de cianobactérias pode servir como indicador do potencial tóxico de determinada massa de água. Tanto na Austrália como na Korea a concentração de células de cianobactérias é utilizada como valor de referência para inferir sobre o estado da qualidade da água e como sistema de alerta de blooms de algas. Em águas para fins recreativos a OMS (2003) a fim de prevenir efeitos irritantes e alérgicos por contacto recomenda um valor limite de cianobactérias de $2x10^4$ cel/mL. Griffiths e Saker (2003) propõem como valor limite guia densidades celulares para *Cylindrospermopsis raciborskii,* contendo cilindrospermopsina no meio intracelular, de $404x10^3$ cel/mL. A Australian Drinking Water Guidelines recomenda alerta quando a densidade de células de *Cylindrospermopsis* é de $2X10^3$ por mL, onde os blooms podem conter toxina suficiente para ser motivo de preocupação para a saúde humana (Baker *et al.* 2002). Como se pode observar na figura nº22, em todas as datas de amostragem na lagoa da Vela os valores de referência propostos são ultrapassados, em termos de quantidade de cianobactérias em geral e de *Cylindrospermopsis*. Constata-se portanto, que os utilizadores poderão estar expostos a um risco potencial.

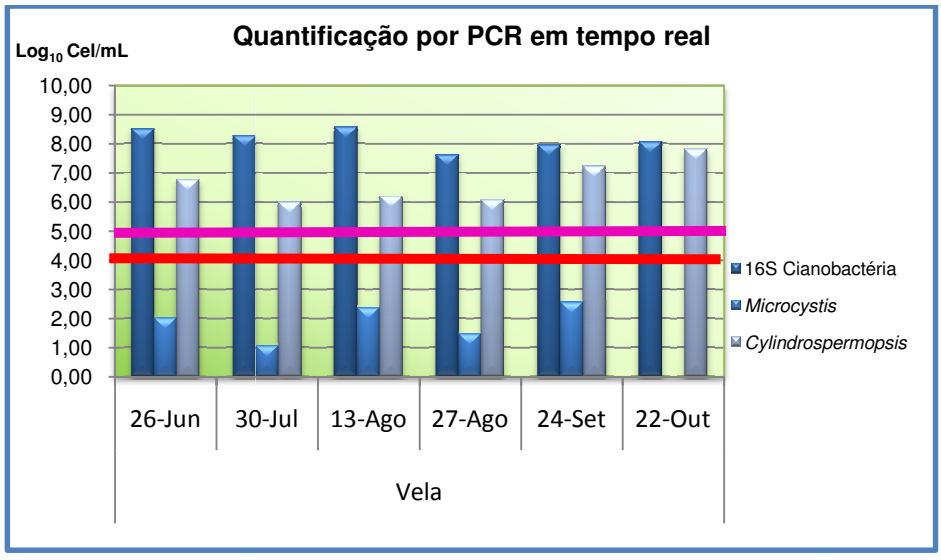


Figura nº 22 – Quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real nas amostras da lagoa da Vela, com indicação dos valores limite propostos por algumas instituições/autores.

Valor guia proposto pela OMS (2003).

Valor guia de proposto por Griffiths e Saker (2003).

Na lagoa de Mira, como se pode verificar na figura nº23, o valor limite de referência da OMS apenas foi ultrapassado na data de 27-Ago. Se este resultado for comparado com o resultado obtido por ELISA, isto sugere que, a quantificação por métodos moleculares utilizando a referência proposta pela OMS, não é suficiente para prever a quantidade de toxina presente na amostra, pois na data de 26-Jun foi quando a concentração de microcistina-LR equivalente foi superior, e no entanto, o número de células por mL está abaixo do valor de referência.

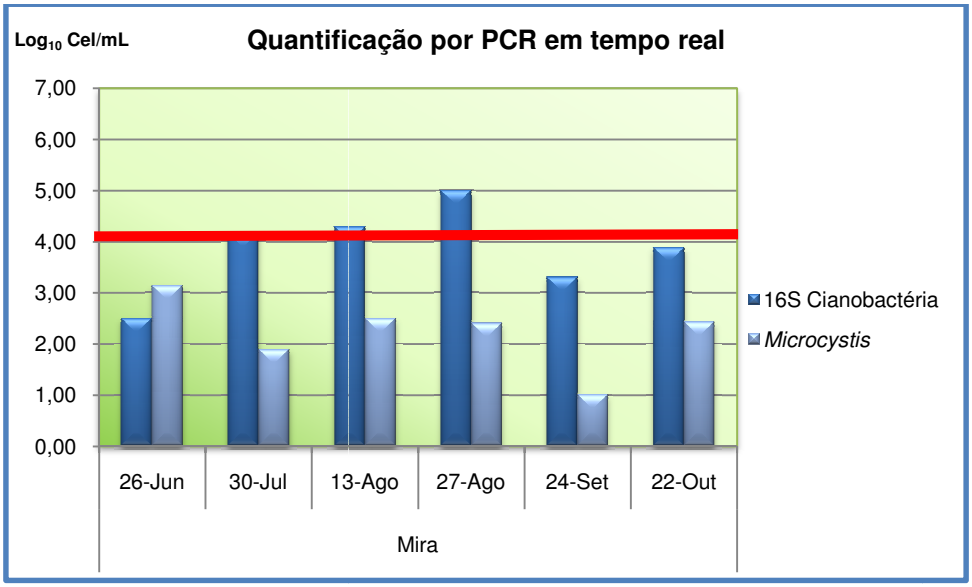


Figura nº 23 - Quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas por PCR em tempo real nas amostras da lagoa de Mira, com indicação do valor limite proposto pela OMS.

Nos programas de monitorização deve ser efectuada a detecção e quantificação da densidade celular das cianobactérias e os resultados devem ser complementados com a quantificação da concentração das toxinas (Messineo *et al.* 2009). Tanto microcistina como cilindrospermopsina podem estar no meio extracelular, por isso a toxina quantificada na água pode não estar correlacionada com a densidade celular (Messineo *et al.* 2009). A análise de morfoespécies pode ser indicativa da produção de microcistinas, no entanto, análise quantitativa da concentração de microcistina é indispensável para o controlo dos perigos de intoxicação (Via-Ordorika *et al.* 2004).

4.3 – Optimização de volumes de amostragem para monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas e suas toxinas

As cianobactérias não se encontram distribuídas de forma homogénea nas massas de água. Teoricamente um maior volume de amostra contém em termos probabilísticos maior número de células, inferindo-se que seja mais representativo.

Em todos os volumes amostrados foi detectada por PCR convencional a presença de cianobactérias, pela amplificação do gene *16S rRNA*. Também se verificou a presença de *Microcystis* em todos os volumes amostrados nas duas lagoas, e a presença de *Cylindrospermopsis* em todos os volumes da lagoa da Vela. Todavia, em relação à detecção de genes responsáveis pela biossíntese de microcistina os resultados não são coerentes com os anteriores (tabela 5). Na lagoa de Mira, em todas as datas, não tinham sido detectados os genes *mcyA, mcyE* e o fragmento que amplifica com os *primers Hep*. Nas amostras ambientais da lagoa da Vela, nas datas de 24-Set e 22-Out tinha sido apenas detectada a presença do gene *mcyE* e do fragmento que amplifica com os *primers Hep*. Porém, em alguns dos volumes colhidos nesta lagoa foi detectado o gene *mcyA*. Além disso, o fragmento que amplifica com os *primers Hep* tinha sido detectado na data de amostragem de 24-Set e, nas amostras dos volumes não se obteve amplificação. Numa primeira análise, a maioria destes resultados parece depender da eficácia da extracção do DNA (figura nº14). Na maioria das amostras a intensidade das bandas obtidas no gel de agarose correspondente à amplificação do gene *16S rRNA* (figura nº15) e do gene *rpoC1* específico para *Cylindrospermopsis* (figura nº16) é proporcional à concentração de DNA extraído. De facto, a eficácia da extracção parece ser determinante, no entanto, o volume de 2 mL de 22-Out da lagoa da Vela, tem uma baixa concentração de DNA em comparação com outros volumes da mesma data, contudo as amplificações foram bem sucedidas nos resultados obtidos por PCR convencional e por PCR em tempo real. As amostras ambientais podem conter microrganismos e outras substâncias que podem interferir com a reacção de PCR (Hisbergues *et al.* 2003). A turvação da água colhida pode ser também uma determinante. Quanto maior o volume de amostra, maior poderá ser a quantidade de inibidores da reacção, como ácidos húmicos, nomeadamente, em amostras muito turvas.

Há uma relação muito próxima entre a presença de genes *mcy* e a presença de microcistinas. A análise das amostras por PCR em tempo real permitiu não só detectar, mas também quantificar cianobactérias potencialmente tóxicas e genes implicados na biossíntese das cianotoxinas (*mcyA)*. O PCR em tempo real mostrou-se mais sensível do que o PCR convencional, pois permitiu a detecção do gene *mcyA* em todos os volumes

de amostragem. O gene *mcyA* permite uma distinção selectiva dos vários géneros produtores de microcistina (Hisbergues *et al.* 2003). Foi reportado que é possível detectar e quantificar o gene *mcyA* por PCR em tempo real a partir de amostras ambientais (Furukawa *et al.* 2006). O mesmo autor encontrou uma correlação positiva entre a quantidade de cópias do gene *mcyA* e a quantificação do número de células por microscopia. A quantificação por PCR em tempo real do gene *mcyA* é uma ferramenta de monitorização rápida e sensível para a quantificação de cianobactérias tóxicas numa amostra de água (Furukawa *et al.* 2006).

Nos volumes amostrados em ambas as lagoas foi possível quantificar por PCR em tempo real a densidade celular das cianobactérias. Contudo, não foi possível obter resultados reprodutíveis em todos os volumes para todos os parâmetros analisados, pela formação de dímeros com picos de intensidade de fluorescência idêntica à dos picos da temperatura de *Melting*. Por PCR convencional, a intensidade das bandas no gel de agarose resultantes da amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* e do gene *mcyA* foi muito baixa (anexo 1), o que sugere que as baixas densidades celulares podem ser a origem de resultados pouco reprodutíveis por PCR em tempo real em alguns dos volumes. Na lagoa de Mira, os menores volumes (250 mL em 24-Set e 100 mL em 22-Out) das duas datas de amostragem foram os únicos em que foi possível uma detecção e quantificação reprodutível de todos os parâmetros analisados por PCR em tempo real (figura nº17). Nos restantes volumes não foi possível uma quantificação reprodutível do gene *mcyA* e no volume de 1000 mL de 24-Set do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*. Nos volumes da lagoa de Mira a densidade de cianobactérias (aproximadamente $1x10^3$ cel/mL) quantificada foi 10 vezes superior à densidade celular de *Microcystis* (aproximadamente $1x10^2$ cel/mL) e a densidade desta 10 vezes superior à quantidade do gene *mcyA* (aproximadamente $1x10^1$ cel/mL). É sabido que a produção de toxinas pelas cianobactérias depende da expressão funcional de conjuntos específicos de genes codificados dentro de operões (Pearson and Neilan 2008). Estes resultados sugerem que *Microcystis* não é o único género de cianobactéria com o gene *mcyA* presente na lagoa de Mira, ou que se pode tratar de diferentes estirpes de *Microcystis*, umas com genótipo potencialmente tóxico (presença do gene *mcyA*) e outras não.

No que respeita aos resultados obtidos por PCR em tempo real na lagoa da Vela, estes variam ligeiramente em relação aos resultados obtidos para as amostras ambientais. A quantidade de cianobactérias, nomeadamente *Cylindrospermopsis,* é bastante inferior, aproximando-se da quantidade de *Microcystis*. Na lagoa da Vela também os volumes menores (15 mL em 24-Set e 2 mL em 22-Out) foram os que permitiram resultados mais fiáveis (figura nº18). As densidades celulares das

cianobactérias potencialmente tóxicas (*Cylindrospermopsis* e *Microcystis*) variam ligeiramente entre os volumes maiores, no entanto, a variação dos volumes menores para os volumes maiores é relativamente elevada. Do volume de 2 mL de 22-Out para o volume de 50 mL da mesma data, por exemplo, a variação do número de células é de aproximadamente 100 vezes ($1x10^2$ cel/mL) para *Cylindrospermopsis*. Este resultado sugere que nos volumes maiores podemos estar a subestimar a densidade celular das cianobactérias potencialmente tóxicas. A possível razão para este acontecimento é a presença de potenciais inibidores de reacção nos volumes maiores, uma vez que a água da lagoa da Vela apresentava uma elevada quantidade de sólidos suspensos. Salienta-se ainda nestes resultados as densidades celulares referentes ao volume de 15 mL de 24-Set na lagoa da Vela. A quantificação do gene *mcyA*, em células equivalentes, foi superior à quantificação obtida para o gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*, sugerindo efectivamente, que também que na lagoa da Vela *Microcystis* não é o único género de cianobactéria com genes *mcy.* Várias explicações têm sido propostas para clarificar consistentemente a maior quantificação dos genes alvo quando comparados com o número de células de cianobactérias. As razões mais prováveis deste acontecimento são múltiplas cópias do genoma, contagem de DNA alvo em células mortas e espécies tóxicas atípicas na amostra de água (Rasmussen *et al.* 2007).

No que concerne aos resultados de ELISA, embora fosse detectada a presença de genes *mcy* não se detectou microcistina-LR equivalente. A presença de ácidos húmicos pode ter influenciado este resultado, pois concentrações superiores a 1 mg/L parecem afectar a reprodutibilidade do teste ELISA (Lindner *et al.* 2004). Estes resultados não são coerentes com os das amostras anteriores, particularmente para a data de 24-Set em que tinha sido quantificada uma concentração elevada de microcistina-LR equivalente. Apesar da densidade de cianobactérias quantificada ser inferior, esperava-se a detecção da toxina. Resultados mais concordantes foram obtidos por ELISA para cilindrospermopsina, em que as concentrações de toxina permaneceram em zero µg/L.

4.4 – Cianobactérias isoladas nas lagoas de Mira e Vela e seu potencial tóxico

Em ambas as lagoas foi encontrada uma grande diversidade de cianobactérias. Trabalhos já realizados anteriormente indicam que as cianobactérias são abundantes em lagoas do centro do país (Vasconcelos 1993). Na lagoa de Mira predominaram cianobactérias da família *Oscillatoriales*. Na lagoa da Vela predominaram em termos de quantidade cianobactérias da família *Nostocaceae*, no entanto, foram isoladas maioritariamente cianobactérias da família *Oscillatoriales*. Ambas as lagoas são locais susceptíveis de conter cianobactérias pois a água é predominantemente estagnada e rodeada por campos agrícolas, que promovem a introdução de nutrientes através da lixiviação.

Uma vez que as cianobactérias identificadas eram filamentosas, o seu isolamento foi bastante difícil, e por isso não foi possível para todos os géneros observados, factor potenciado pelo sobrecrescimento de algas verdes. Situação semelhante foi obtida por Saker *et al.* (2005b) em estudos que efectuou.

Os resultados obtidos por PCR convencional não são concordantes com os resultados obtidos por ELISA e MALDI-TOF MS, pois para as culturas isoladas foi verificada a presença de genes *mcy*, no entanto, não se detectou nem quantificou microcistina-LR equivalente. Tem sido relatado, que ao longo do tempo as estirpes de cianobactérias que estão em cultura podem sofrer mutações genéticas que resultam na perda de produção da toxina (Saker *et al.* 2005b). No entanto, os estudos de laboratório demonstram que o potencial tóxico de uma estirpe, depende em última análise da presença dos genes responsáveis pela produção da toxina (Person and Neilan 2008) e, do facto dos factores ambientais promoverem essa expressão. Portanto, se as cianobactérias têm os genes presentes podem vir a produzir a toxina se as condições forem apropriadas. Algumas das cianobactérias isoladas em ambas as lagoas, tinham presentes genes *mcy*, no entanto, nenhuma das estirpes pertence ao género *Microcystis*. Resultados obtidos por Saker *et al.* (2007a) indicam que *Microcystis* não é a única cianobactéria produtora de microcistinas nas águas de rios e lagoas Portuguesas, incluindo a lagoa de Mira. *Planktothrix* parece ser também uma espécie produtora (Saker *et al.* 2007a). Aliás sabe-se que microcistina é também produzida por cianobactérias como *Anabaena* e *Nostoc* (Saker *et al.* 2007a), pertencentes à família *Nostocaceae*. Das 19 culturas isoladas na lagoa da Vela, apenas 6 estirpes continham genes implicados na biossíntese de microcistina. Das 6 estirpes potencialmente produtoras de microcistina, 4 pertenciam à família *Nostocaceae*. Inclusivamente 100% das estirpes isoladas que

pertenciam a esta família tinham presentes genes responsáveis pela biossíntese de microcistina e, 25% resultados positivos para o fragmento que amplifica com os *primers Hep*. Curiosamente *Cylindrospermopsis raciborskii*, conhecida como produtora de cilindrospermopsina, teve resultados positivos para a presença de genes responsáveis pela biossíntese de microcistina, nomeadamente, os genes *mcyA* e *mcyE*. Além de se comprovar por sequenciação molecular que se tratava desta cianobactéria, a sua identificação já tinha sido efectuada microscopicamente. *Cylindrospermopsis raciborskii* caracteriza-se principalmente pela presença de vacúolos gasosos e pelas dimensões dos heterocistos terminais (Wilson *et al*, 2000). As populações de cianobactérias que constituem os blooms têm uma variedade de genótipos, cada um com diferente capacidade para produzir microcistinas e outros péptidos (Saker *et al.* 2005b). Quando são detectadas elevadas concentrações de microcistina, associa-se sempre à presença de *Microcystis*. Contudo, *Microcystis* é uma espécie coexistente com outras cianobactérias, nomeadamente *Aphanizomenon*, *Merismopedia* e *Oscillatoriales* (Saker *et al.* 2003). Neste estudo, elevadas concentrações de microcistina foram quantificadas na lagoa da Vela quando havia a predominância das espécies *Aphanizomenon aphanizomenoides* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, que tinham presentes os genes *mcyA* e *mcy*E, podendo indicar que estas espécies poderão ser potenciais produtoras de microcistina. Saker *et al* (2003) reportou a presença de *Cylindrospermopsis raciborskii* em muitas massas de água Portuguesas utilizadas para consumo e fins recreativos, que apesar de os resultados da pesquisa de cilindrospermopsina serem negativos, as culturas puras mostraram uma toxicidade atípica em bioensaios com ratos, sugerindo que um novo tipo de toxina pode estar presente. As amostras positivas em relação ao gene *mcy*A têm mostrado uma elevada probabilidade de produzir microcistinas (Hisbergues *et al.* 2003). Além disso, estudos revelam que uma pequena percentagem de colónias produtoras de microcistinas não forma produto de PCR para o gene *mcy*A, contudo, podem haver mutações naturais que resultam numa inserção ou depleção que podem afectar a detecção do gene por PCR (Saker *et al.* 2007a). Enquanto os genes do complexo NRPS, *mcyA* e *mcyB,* provaram ser bons alvos para detectar os genótipos hepatotóxicos, o gene da combinação dos complexos PKS/NRPS, *mcyE*, é o alvo para detectar os produtores de microcistinas (Pearson and Neilan 2008). A escolha do gene *mcyE* para monitorização é lógica pois ele é essencial para a síntese do aminoácido Adda que é crucial para a estrutura química da toxina (Pearson and Neilan 2008).

Os resultados de ELISA são concordantes com os de MALDI-TOF MS, pois não se quantificou microcistina-LR equivalente nem se detectou a presença de moleculas com a respectiva massa molecular. No entanto, nos resultados obtidos para as amostras ambientais, nas datas onde é quantificada a maior concentração de microcistina-LR

equivalente, corresponde às datas em que foi isolada a maioria das estirpes que continham genes implicados na síntese de microcistinas (tabela nº11). Embora a presença de microcistinas e cilindrospermopsina sejam o alvo de principal interesse nas amostras de água doce, é importante constatar que muitas destas cianobactérias são também fonte de uma vasta gama de outros compostos como os péptidos aeruginosinas, microgininas, anabaenopeptinas, cianopettilinas e microviridinas. (Saker *et al.* 2007b). Nos resultados obtidos por MALDI-TOF MS, na análise das culturas isoladas, observou-se uma elevada quantidade de moléculas. Apesar de nenhuma delas corresponder a microcistina-LR ou outras variantes de microcistina, a estirpe de *Leptolyngbya frígida* isolada em 24-Set da lagoa de Mira, continha uma molecula com uma massa muito aproximada à de microcistina-LR, o que sugere que, uma vez que têm massas aproximadas esta molécula pode ser igualmente tóxica. Saker *et al.* (2005b) encontrou por MALDI-TOF MS a produção simultânea de muitas formas químicas de microcistina em estirpes colhidas em reservatórios de água Portugueses. Nesse estudo nove das estirpes que produziam microcistina também continham anabaenopeptinas. As anabaenopeptinas A e B têm mostrado causar vasodilatação em ratos (Saker *et al.* 2005b).

O potencial tóxico das cianobactérias presentes em ambas as lagoas parece existir. Vasconcelos *et al* (1993) testou a toxicidade de estirpes de *Microcystis aeruginosa* isoladas nas lagoas de Mira e da Vela usando bioensaios com murganhos e verificou que 100% das estirpes apresentaram toxicidade. Em estudos efectuados na lagoa de Mira, o autor verificou que em apenas 6 dias houve uma diminuição da toxicidade de cerca de 10 vezes (Vasconcelos 1995). A toxicidade numa lagoa pode variar consideravelmente num período de poucos dias, indicando que os blooms são considerados tóxicos, devendo por isso ser evitado o contacto directo com as cianobactérias (Vasconcelos *et al.* 1993). Vasconcelos (1995) em estudos que efectuou com várias estirpes de *Microcystis aeruginosa* encontrou uma tendência para microcistina-LR ser a toxina principal. Esta toxina parece ser a mais comum em outros países, no entanto, outras variantes de microcistinas (microcistina-RR, microcistina-YR e microcistina-LA) podem ocorrer com frequência significativa em águas portuguesas. Na lagoa da Vela, o aumento da biomassa de fitoplâncton, o aumento da turbidez e a presença e proliferação de cianobactérias são algumas das características associadas ao processo de eutrofização desta lagoa, o que pode comprometer o seu uso para fins recreativos (Abrantes *et al.* 2006). A exposição por contacto dérmico não deve ser ignorada, águas recreativas que contenham blooms de cianobactérias podem expor os banhistas às cianotoxinas (Msagati *et al.* 2006). Embora a água de ambas as lagoas não seja utilizada para consumo, o risco para a saúde humana decorrente da exposição a cianotoxinas durante o uso recreativo é

compreendido por três vias: contacto directo por várias partes do corpo, incluindo áreas sensíveis, como os olhos, ouvidos, boca, garganta e áreas cobertas pelo vestuário de banho (pode haver acumulação de células de cianobactérias); bebida acidental de água e inalação de células cianobacterianas através de aerossóis (WHO 2003). A exposição através do contacto dérmico pode causar irritação nos olhos, ouvidos e pele, conhecida como dermatite ou prurido, assim como sintomas gastrointestinais (diarreia e vómitos) (Msagati *et al.* 2006). As reacções alérgicas ou irritantes da pele reportadas, variam em termos de severidade dependendo do género de cianobactérias (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Gloeotrichia)* presentes na água após a exposição através do uso para fins recreativos (WHO 2003).

Nestas lagoas além da exposição por contacto, pode ainda haver exposição pela ingestão das toxinas através dos alimentos. Ambas as lagoas são utilizadas para pesca desportiva. Os principais problemas de saúde causados por microcistinas são aqueles que estão associados a intoxicações crónicas (Amorim and Vasconcelos 1999). A exposição crónica a toxinas de cianobactérias ocorre principalmente através da dieta (Msagati *et al.* 2006). Altas densidades celulares de cianobactérias tóxicas resultam em altas taxas de eficiência de retenção de toxina por parte dos organismos (Amorim and Vasconcelos 1999). Um aspecto importante é que a maioria das cianotoxinas não são lipofílicas e por isso não deveriam ter uma grande tendência para se acumular ao longo da cadeia alimentar. Não obstante, o simples facto dos crustáceos e dos moluscos se poderem alimentar de cianobactérias tóxicas, torna-os potenciais vectores de cianotoxinas ao longo da cadeia alimentar. Aliás vários estudos evidenciam que estes organismos acumulam as cianobactérias (Amorim and Vasconcelos 1999; Vasconcelos 2001; Vasconcelos 2006). Amorim e Vasconcelos (1999) propõem que cianobactérias potencialmente tóxicas não devem exceder densidades celulares superiores a aproximadamente $1x10^4$ cél/mL, pelo potencial risco de haver acumulação de microcistinas em moluscos. As microcistinas acumulam-se em moluscos e nos tecidos dos peixes, nomeadamente nas vísceras (Msagati *et al.* 2006). O lagostim *Cherax quadricarinatus* acumula cilindrospermopsina produzida por *Cylindrospermopsis raciborskii* (Saker and Eaglesham 1999). Ensaios efectuados com cilindrospermopsina em moluscos bivalves, *Anodonta cygnea,* colhidos na lagoa de Mira, mostram que este organismo acumula a toxina (Saker *et al.* 2004). Embora nestas lagoas, estes organismos não sejam produzidos para consumo humano, é sabido que são consumidos pelas pessoas que vivem nas habitações circundantes (Saker *et al.* 2004).

A obrigatoriedade da monitorização de microcistina-LR em águas de consumo está legislada em Portugal. A legislação Portuguesa estabelece que caso seja confirmado um número de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas superior a

$2x10^3$ cél/mL deve ser aumentada a frequência de amostragem para a análise de microcistina-LR. Apesar de existir um programa nacional de monitorização da qualidade da água, da responsabilidade das Direcções Regionais do Ambiente e Recursos Naturais – DRARN's e do Instituto da Água – INAG apenas é avaliada a concentração de microcistina-LR. No entanto, outras cianobactérias potencialmente tóxicas e as suas toxinas deviam ser monitorizados a fim de prevenir/evitar riscos para a saúde humana.

5 – Conclusão

A elaboração deste trabalho permitiu concluir que:

- Os métodos moleculares permitiram detectar e quantificar de forma eficaz e reprodutível cianobactérias potencialmente tóxicas e genes responsáveis pela biossíntese de cianotoxinas, mostrando ser uma ferramenta extremamente útil para a monitorização e alerta precoce de potenciais riscos para a saúde humana;
- Dentro dos métodos moleculares o PCR em tempo real permite ter uma maior percepção do estado de contaminação da água e parece ser mais sensível do que o PCR convencional, pois permite saber quais as cianobactérias que estão em maior concentração e embora em algumas amostras com baixa concentração de cianobactérias não fosse possível uma quantificação reprodutível, a detecção foi sempre efectuada;
- O método imunológico utilizado, ELISA, parece ser uma técnica bastante sensível, permitindo a quantificação de concentrações de microcistina-LR equivalente, neste caso, não detectáveis por HPLC;
- Em termos de monitorização deve ser sempre efectuada a identificação e quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas, mas também a quantificação da concentração de toxina, pois nem sempre a densidade de cianobactérias esteve relacionada com a concentração de toxina. Portanto, se não for utilizada uma abordagem multidisciplinar, a concentração de toxina pode ser subestimada;
- Em amostras que apresentem elevados níveis de turvação, volumes menores permitem um melhor limite de detecção/quantificação de cianobactérias potencialmente tóxicas e genes implicados na biossíntese de toxinas. A possível explicação para este facto pode residir na menor quantidade de inibidores, no entanto, uma extracção eficiente do DNA também parece ser imprescindível;
- A presença de genes pertencentes ao *cluster mcy* nem sempre esteve relacionada com a concentração da toxina, talvez porque foi testado um pequeno número de genes pertencentes ao *cluster*;
- O género *Microcystis* não é o único que contêm genes *mcy*, pois estes genes foram encontrados em cianobactérias pertencentes às famílias *Notocaceae* (*Anabaena, Aphanizomenon e Cylindrospermopsis)* e *Oscillatoriales (Leptolyngbya e Geitlerinema)*;
- A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, embora tenha sido encontrada em elevada densidade não se mostrou produtora de cilindrospermopsina;

- Nas lagoas de Mira e Vela as cianobactérias encontradas parecem ter potencial tóxico. Apesar de não ter sido quantificada toxina, as cianobactérias presentes continham alguns dos genes do *cluster mcy*, podendo, se as condições ambientais forem apropriadas, produzir microcistina. Além disso, as cianobactérias presentes apresentaram por MALDI-TOF MS uma grande variedade de moléculas, que embora não sejam conhecidas podem ter efeitos biológicos negativos;
- A monitorização das lagoas de Mira e Vela deve ser assegurada com frequência, uma vez que pode haver riscos para a saúde humana decorrentes da utilização da água para fins recreativos, ou através da ingestão de produtos de pesca contaminados com cianotoxinas.

No que concerne às limitações deste estudo, estas dizem respeito ao tempo de amostragem. Neste estudo podem ter ocorrido erros aleatórios, relacionados com o processo de selecção aleatória da amostragem. Para diminuir esses erros seria necessário aumentar a dimensão da amostra. Em relação às interpretações retiradas, estas também podem conter erros devido às variáveis de confundimento que não estejam a ser consideradas.

Como trabalhos futuros sugere-se:

- A medição da turvação com disco de Secchi ou por turbidimetria/espectrofotometria para efectuar correlações com o volume de amostragem mais adequado;
- A realização de um multiplex para a detecção dos vários genes pertencentes ao *cluster mcy*;
- A realização de HPLC com pesquisa de outras variantes de microcistina para comparação com os resultados obtidos por ELISA;
- A realização de ensaios de toxicidade com as estirpes isoladas em ambas as lagoas, que continham genes implicados na biossíntese de microcistina.

6 – Bibliografia

Abrantes N, Antunes SC, Pereira MJ, Gonçalves F. 2006. Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica,* **29**(1):54-64.

Amorim Á, Vasconcelos VM. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon,* **37**:1041-1052.

Andersen RA. 2005. Algal Culturing Techniques. Vol. 8. pp.125-127. Academic Press Elsevier.

Baker JA, Entsch B, Neilan BA, McKay DB. 2002. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology,* **68 (12)**:6070-6076.

Berry JP, Gibbs PDL, Schmale MC, Saker ML. 2009. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon,* **In Press**:1-11.

Campàs M, Szydlowska D, Trojanowicz M, Marty J-L. 2005. Towards the protein phosphatase-based biosensor for microcystin detection. *Biosensors and Bioelectronics,* **20**:1520-1530.

Dawson RM. 1997. The toxicology of microcystins. *Toxicon,* **36 (7)**:953-962.

Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. *Diário da República, 1.ª série - N.º 164*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Ding W-X, Shen H-M, Ong C-N. 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspective,* **108**:605-609.

Domingues RB, Barbosa A, Galvão H. 2008. Constraints on the use of phytoplankton as a biological quality element within the Water Framework Directive in Portuguese waters. *Marine Pollution Boletin,* **56**:1389-1395.

Fergusson KM, Saint C. 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology,* **18**:120-125.

Frazão B. 2008. Ocorrência e ecologia de cianobactérias marinhas. *MSc thesis*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology,* **18**:243-251.

Froscio SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer IR. 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon,* **51**:191-198.

Furukawa K, Noda N, Tsuneda S, Saito T, Itayama T, Inamori Y. 2006. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of Biocience and Bioengineering,* **102 (2)**:90-96.

Gkelis S, Lanaras T, Sivonen K. 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquatic Toxicology,* **78**:32-41.

Gonçalves F, Ribeiro R, Vasconcelos VM, Soares AMVM. 1996. Anthropogenic influencis on seasonal changes of nutrients, physical and chemical factors in three coastal freshwater shallow lakes (Portugal). *Limnetica,* **12 (2)**:47-52.

Griffiths DJ, Saker ML. 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology,* **18**:78-93.

Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archeology Microbiology,* **180**:402-410.

Humpage AR, Falconer IR. 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology,* **18**:94-103.

Ibelings BW, Chorus I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater ‘‘seafood’’ and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution,* **150**:177-192.

Jungblut A-D, Neilan BA. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin synthetases genes in the three orders of cyanobacteria. *Archive Microbiology,* **185**:107-114.

Kellman R, Mills T, Neilan BA. 2006. Functional modeling and phylogenetic distribuition of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *Journal Mololecular Evolution,* **62**:267-2270.

Komarek J, Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokariota 1. Chroococcales: Gustav Fischer Verlag. Stuttgard. 548

Komarek J, Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokariota 2. Oscillatoriales, Elsevier GmbH, München. 749 pp.

Kotai J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research,* B-11/69. Binder. Oslo:5.

Kurmayer R, Kutzenberger T. 2003. Application of real-time PCR for quantification of micricystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp. Applied and Environmental Microbiology,* **69 (11)**:6723-6730.

Lindner P, Molza R, Yacoub-George E, Dürkop A, Wolf H. 2004. Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. *Analytica Chimica Acta,* **521**:37-44.

Martins JC, Leão PN, Vasconcelos VM. 2009. Differential protein expression in *Corbicula fluminea* upon exposure to a *Microcystis aeruginosa* toxic strain. *Toxicon,* **53**:409-416.

Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Lugliè A, Casiddu P, Antonietta M, Padedda BM, Di Corcia, Mazza R and others. 2009. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologia,* **In Press**.

Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. 1999. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of micocystins and nodularin. *Water Research* **34 (10)**:2761-2769.

Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology,* **78**:382-397.

Neilan BA, Jacobs D, Deldot T, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal System Bacteriology,* **47**:693-697.

Nolan T, E Hands R, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols,* **1(3)**:1159-1182.

Nonneman D, Zimba PV. 2002. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal Phycology,* **38(1)**:230-233.

Noris RLG, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GKS, M.J., Chriswell RK, Moore MR. 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in mouse. *Toxicon,* **40**:471-476.

Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology,* **63(8)**:3327-3332.

Oliveira MR. 1991. Eutrofização do rio Guadiana. "Blooms" de Cyanophyceae e influência na ictiofauna. *Relatório Técnico Cientifíco INIP,* **8**:27.

Ouahid Y. 2008. Short and long-term evolution of cyanobacteria biomass and its microcystin content in the drinking-water supply Pinilla. Identification and characterization of microcystin producing and non-producing *Microcystis* strains. *PhD thesis*. Madrid: Universidade Autónoma de Madrid - Faculdade de Ciências.

Pearson LA, Neilan BA. 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology,* **19**(**3**):281-288.

Pflugmacher S, al. E, et al. 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry,* **25(9)**:2381-2387.

Rantala A, Fewer D, Hisbergues. M., Rouhiainen L, Vaitomaa J, Börner T, Sivonen K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Academic Science,* **101 (2)**:568-573.

Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K. 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta,* **466**:213-231.

Rasmussen JP, Giglio S, Monis PT, Campbell RJ, Saint C. 2007. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology,* **104**:1503-1515.

Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. 2005. Quantification of toxic *Microcystis spp*. during the 2003 and 2004 blooms in western lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science & Technology,* **39**:4198-4205.

Rivasseau C, Racaud P, Deguin A, Hennion M-C. 1999. Evaluation of an ELISA kit for the monitoring of microcystins (cyanobacterial toxins) in water and algae environmental samples. *Environmental Science & Technology,* **33**:1520-1527.

Saker ML, Eaglesham GK. 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon,* **37**:1065-1077.

Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* **55**:243-250.

Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM. 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon,* **43**:185-194.

Saker ML, Jungblut A-D, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. 2005a. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon,* **46**:555-562.

Saker ML, Fastner J, Dittmann E, Christiansen G, Vasconcelos VM. 2005b. Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *Journal of Applied Microbiology,* **99**:749-757.

Saker ML, Vale M, Kramer D, Vasconcelos VM. 2007a. Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied Microbiology and Biotechnology,* **75(2)**:441-449

Saker ML, Welker M, Vasconcelos VM. 2007b. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Applied Microbiology Biotechnology,* **73**:1136-1142.

Schembri M, Neilan B, Saint C. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. *Environmental Toxicology,* **16**:413-421.

Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada K-i, Ito E, Watanabe M. 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon,* **32 (7)**:833-843.

Tillett D, Dittmann E, Erhard M, Dohren Hv, Borner T, Neilan BA. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology,* **7**(753-764).

Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokelke L, Sivonen K. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology,* **69(12)**:7289-7297.

Vale M. 2005. Comunidades planctónicas da albufeira do Torrão. Eutrofização e biodiversidade. *MSc thesis*. Porto: Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Valério E, Pereira P, Saker ML, Franca S, Tenreiro R. 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae,* **4**(1044-1052).

Van den Hoek C, Man D, Jahns H. 1995. Algae: An introduction to phycology. Cambridge: University Press.

Vasconcelos VM. 1993. Toxicity of cyanobacteria in lakes of north and central Portugal. Ecological implications. *International Verein. Limnology,* **25**:694-697.

Vasconcelos VM, Campos T, Amorim A, Soares AMVM. 1993. Toxicidade de estirpes de cianobactérias isoladas a partir das Lagoas de Braças, Vela e Mira. *Boletim UCA,* **1**:193-201.

Vasconcelos VM. 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) In Portuguesa fresh waters. *Archive Hydrobiology,* **130(4)**:439-451.

Vasconcelos VM. 1995. Toxicologia de Cianobactérias. *PhD* thesis. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa Archive Hydrobiology,* **134 (3)**:295-305.

Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. *Water Research,* **30(10)**:2377-2384.

Vasconcelos VM. 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* **32**:249-254.

Vasconcelos VM. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica,* **20 (1)**:45-58.

Vasconcelos VM, Pereira E. 2001. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Research,* **35 (5)**:1354-1357.

Vasconcelos VM. 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica,* **25 (1-2)**:425-432.

Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, Hisbergues M, Dittmann E, Komarek J, Erhard M, Chorus I. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis sp.* in european freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology,* **27**:592-602.

Ward CJ, Beattie KA, Lee EYC, Codd GA. 1997. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters,* **153**:465-473.

Welker M, Marsalek B, Sejnohova L, von Dohren H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides,* **27**:2090-2103.

WHO. 2003. Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Chapter 8: Algae and cyanobacteria in fresh water. Volume 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp 236-258.

Wiedner C, Rücker J, Fastner J, Chorus I, Nixdorf B. 2008. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. *Toxicon,* **52**(**6**):677-686.

Wilson KM, Schembri M.A., Baker P. D., P. SC. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied Environmental Microbiology,* **66 (1)**:332-338.

7 – Anexos

Anexo 1 - Imagens do gel de agarose com a amplificação dos produtos de PCR correspondentes às amostras ambientais, aos diferentes volumes amostrados e às culturas isoladas.

Amostras ambientais

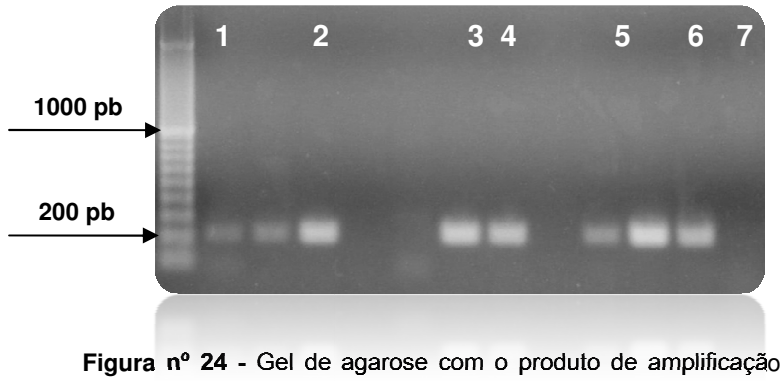


Figura nº 24 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1 – V 26-Jun; 2 - Mi 26-Jun; 3 – V 30-Jul; 4- Mi 30-Jul; 5 – V 13-Ago; 6- Mi 13-Ago; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago e 7-Controlo negativo.

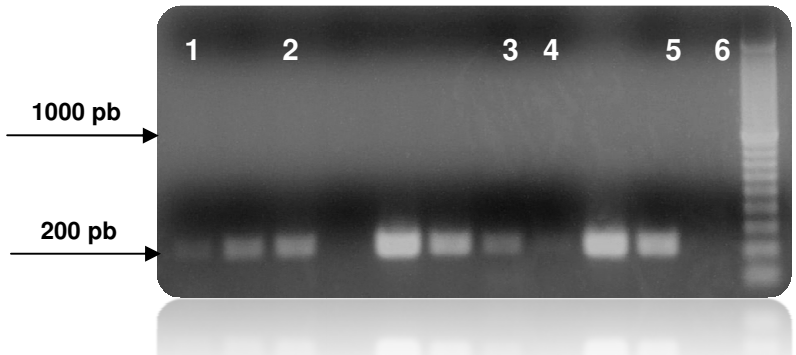


Figura nº 25 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1- V 27-Ago; 22 – Mi 27-Ago; 3 – V 24-Set; 4 – Mi 24-Set; 5-Controlo positivo e 6-Controlo negativo.

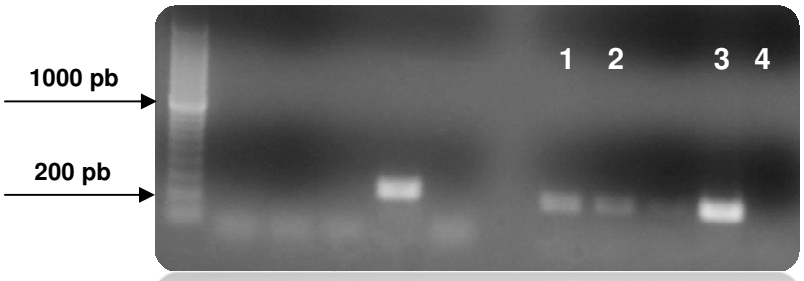


Figura nº 26 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1 – Mi 22-Out; 2 - V 22 –Out; 3 – Controlo positivo e 4-Controlo negativo.

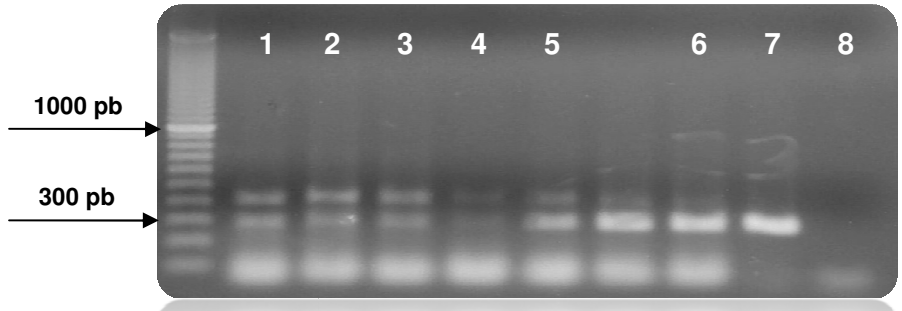


Figura nº 27 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 300 pb. 1- V 26-Jun; 2- V 30-Jul; 3- V 13-Ago; 4- V 27-Ago; 5- V 24-Set; 6- V 22-Out; 7-Controlo positivo e 8- Controlo negativo.

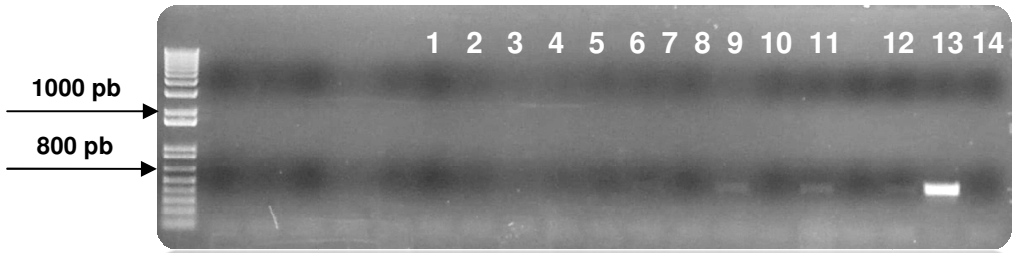


Figura nº 28 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1- Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; 13-Controlo positivo e 14-Controlo negativo.

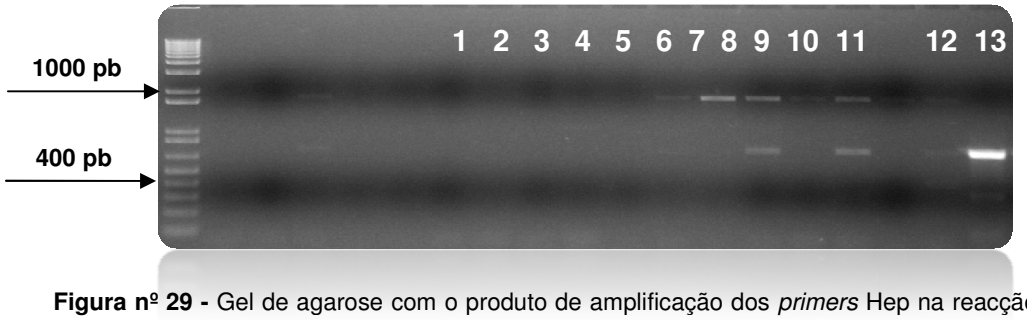


Figura nº 29 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers* Hep na reacção de PCR convencional correspondente às amostras ambientais. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1- Mi 26-Jun; 2- Mi 30-Jul; 3- Mi 13-Ago; 4- Mi 27-Ago; 5- Mi 24-Set; 6- Mi 22-Out; 7- V 26-Jun; 8- V 30-Jul; 9- V 13-Ago; 10- V 27-Ago; 11- V 24-Set; 12- V 22-Out; e 13-Controlo positivo.

Diferentes volumes de amostras ambientais

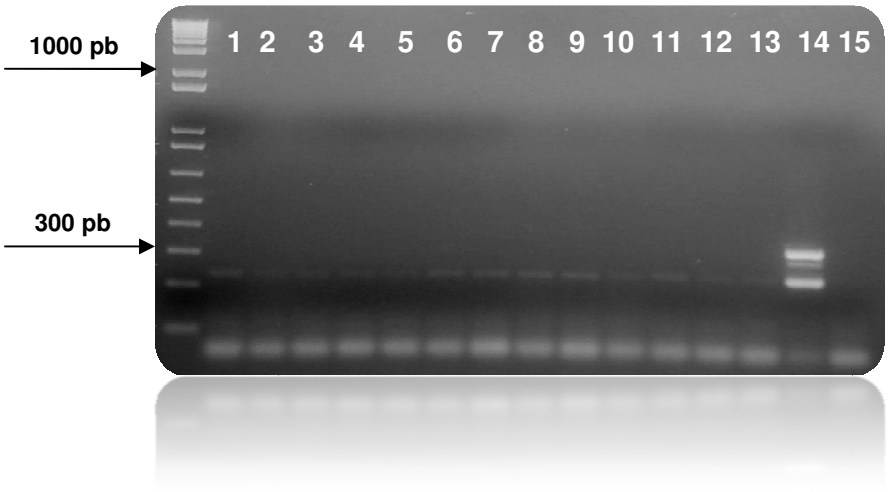


Figura nº 30 – Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* específico para *Microcystis* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 220 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.

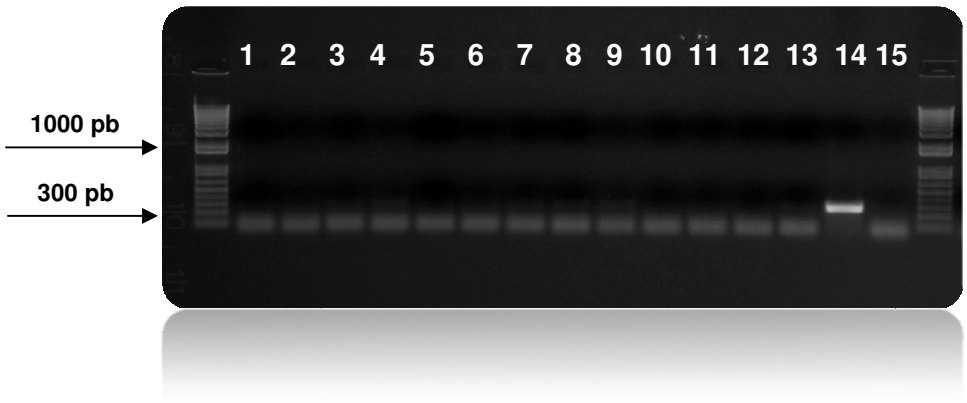


Figura nº 31 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 297 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.



Figura nº 32 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.



Figura nº 33 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers Hep* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras dos volumes. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1- V24-Set 15 mL; 2- V24-Set 50 mL; 3- V 24-Set 250 mL; 4- V 22-Out 22 2mL; 5- V 22-Out 15 mL; 6- V 22-Out 50 mL; 7- V 22-Out 100 mL; 8- Mi 24-Set 250 mL; 9- Mi 24-Set 500 mL; 10- Mi 24-Set 1000 mL; 11- Mi 22-Out 100 mL; 12- Mi 22-Out 250 mL; 13- Mi 22-Out 1000 mL ; 14- Controlo positivo; 15- Controlo negativo.

Culturas isoladas

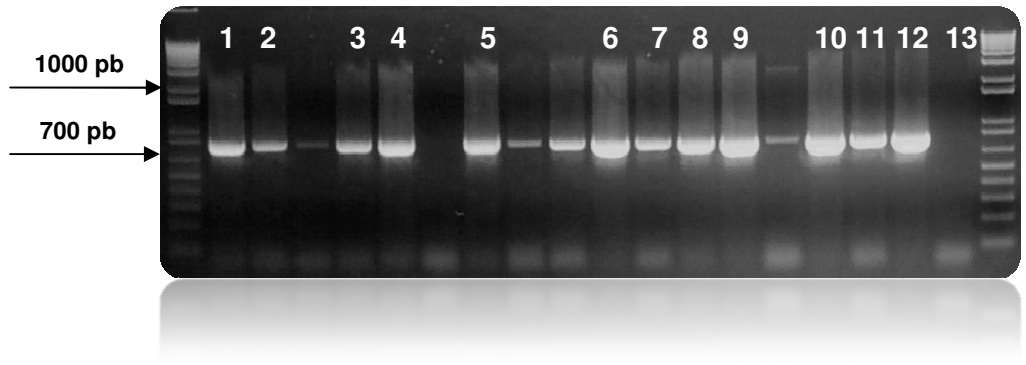


Figura nº 34 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas na Lagoa de Mira. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1-11 – Mi culturas isoladas; 12 – Controlo positivo; 13 – Controlo negativo.

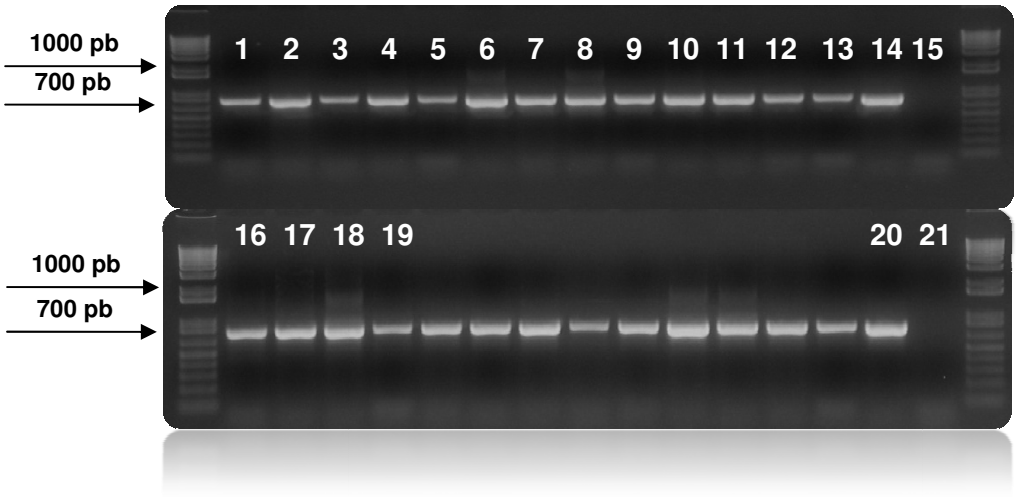


Figura nº 35 - Gel de agarose com o produto de amplificação do gene *16S rRNA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas na Lagoa da Vela. A amplificação do fragmento corresponde a 754 pb. 1- 13 e 16-19 – V culturas isoladas; 14 e 20 – Controlo positivo; 15 e 21 – Controlo negativo.

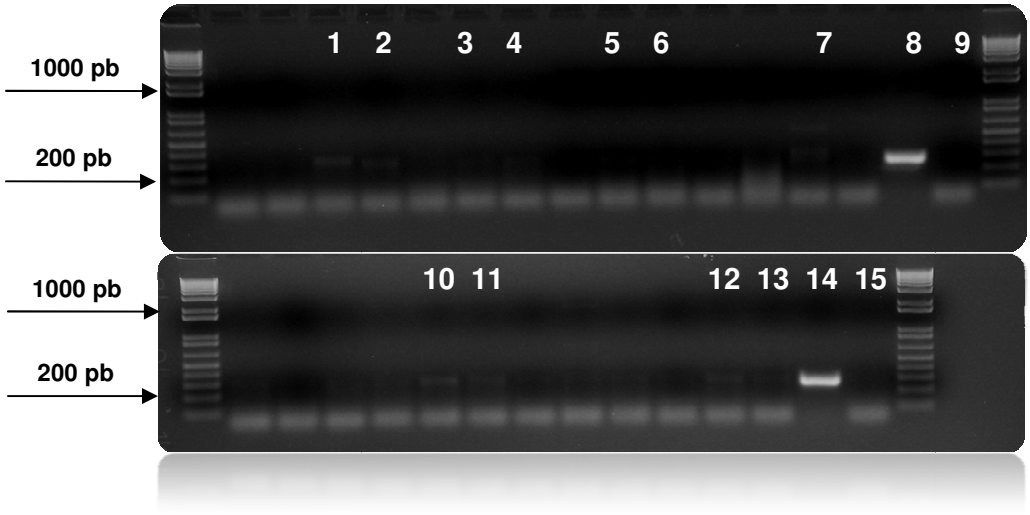


Figura nº 36 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyA* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 297 pb. 1-4 - Culturas isoladas da Lagoa de Mira cujo resultado para o gene *mcyA* foi positivo; 5-7 e 10-13 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para o gene *mcyA* foi positivo;8 e 14- Controlo positivo; 9 e 15- Controlo negativo.

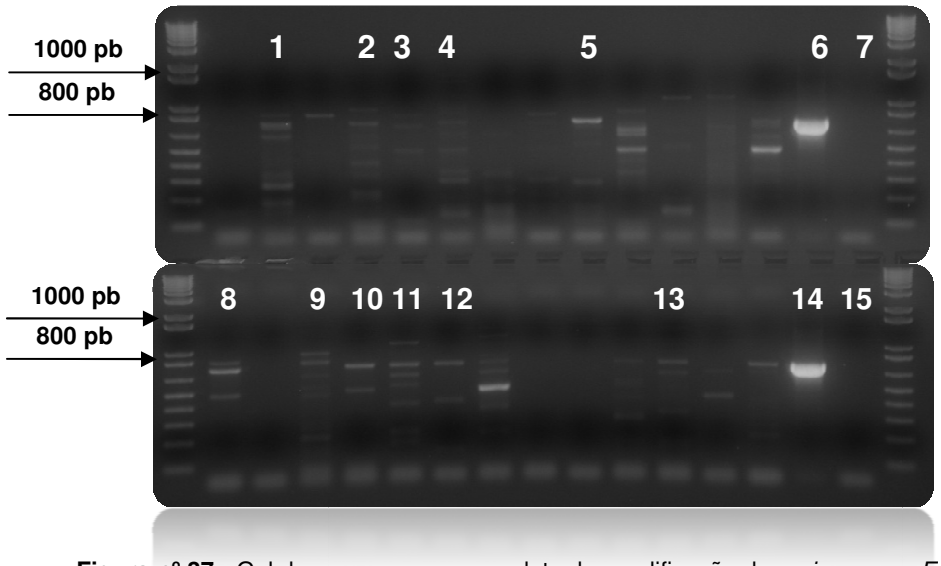


Figura nº 37 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers mcyE* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 812 pb. 1 -4 -Culturas isoladas da Lagoa de Mira cujo resultado para o gene *mcyE* foi positivo; 5,8-13 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para o gene *mcyE* foi positivo; 4 e 14- Controlo positivo; 7 e 15- Controlo negativo.

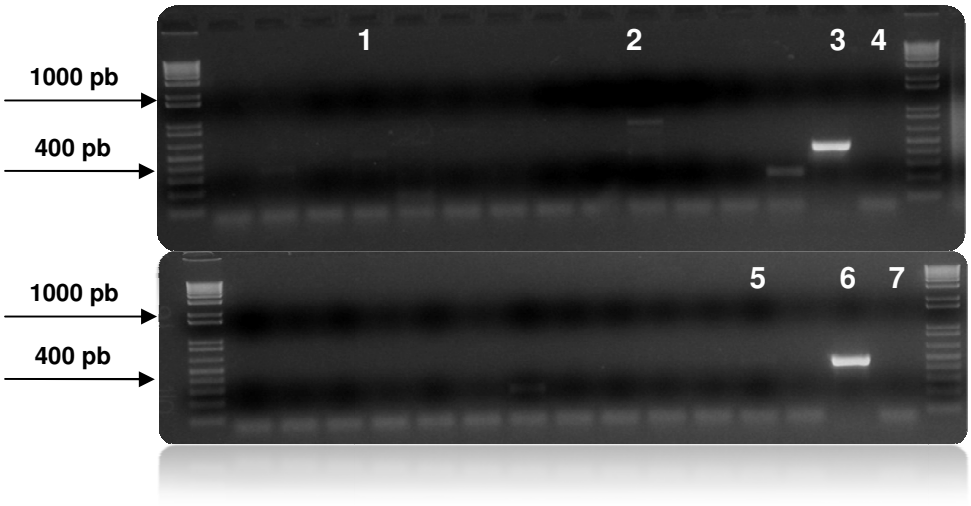
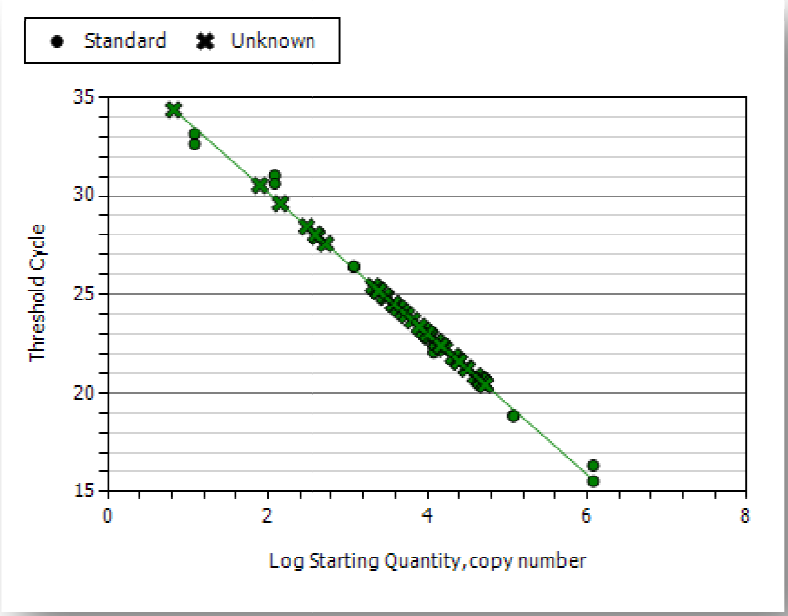


Figura nº 38 - Gel de agarose com o produto de amplificação dos *primers Hep* na reacção de PCR convencional correspondente às amostras das culturas isoladas. A amplificação do fragmento corresponde a 472 pb. 1 - Cultura isolada da Lagoa de Mira cujo resultado para os *primers Hep* foi positivo; 2 e 5 - Culturas isoladas da Lagoa da Vela cujo resultado para os *primers Hep* foi positivo; 3 e 6 – Controlo positivo; 4 e 7- Controlo negativo.

Anexo 2 – Gráficos correspondentes às curvas padrão e temperaturas de *Melting* com os respectivos picos na amplificação por PCR em tempo real.



Fluor	PCR Efficiency(%)	R Squared	Slope	y-Intercept
SYBR1	90,7	0,991	-3,568	37,288

Figura nº 39 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA.*

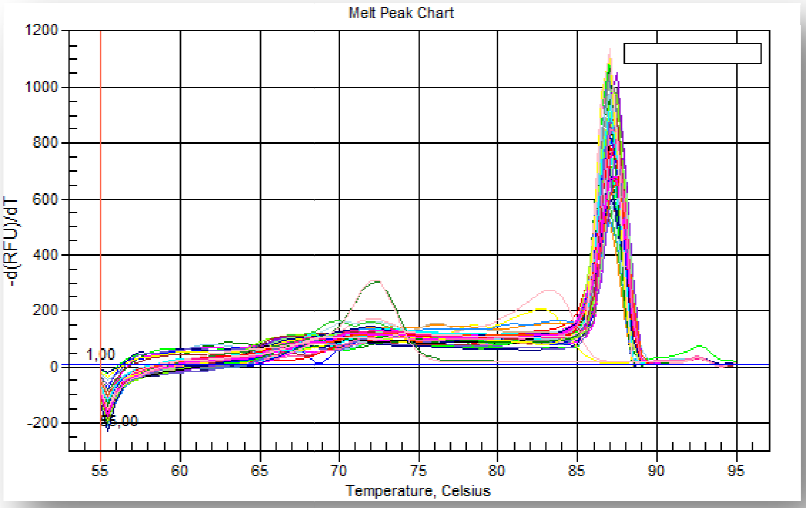


Figura nº 40 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA*.

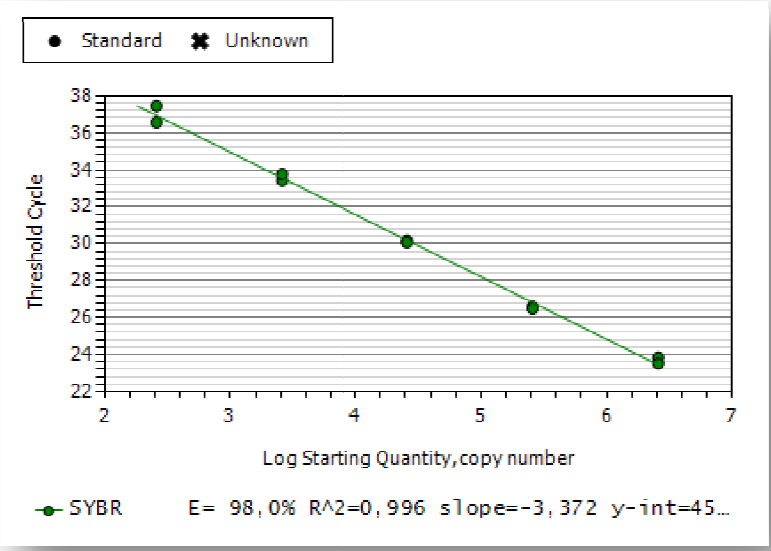


Figura nº 41 – Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis*.

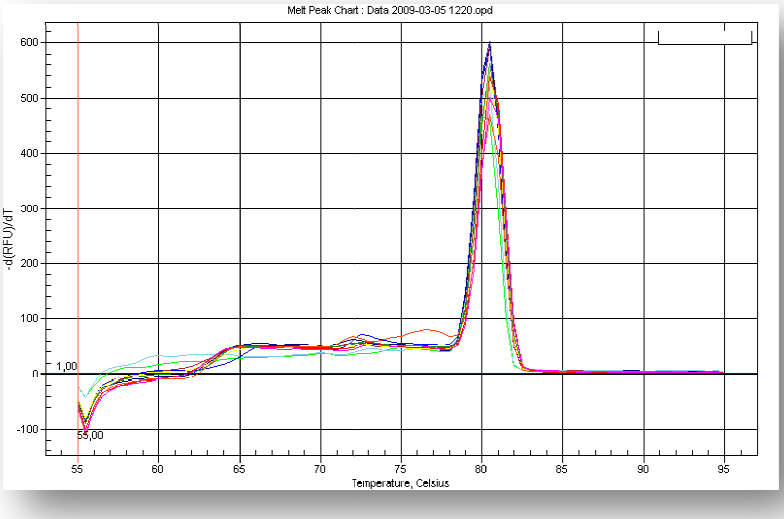


Figura nº 42 – Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *rpoC1* específico de *Cylindrospermopsis*.

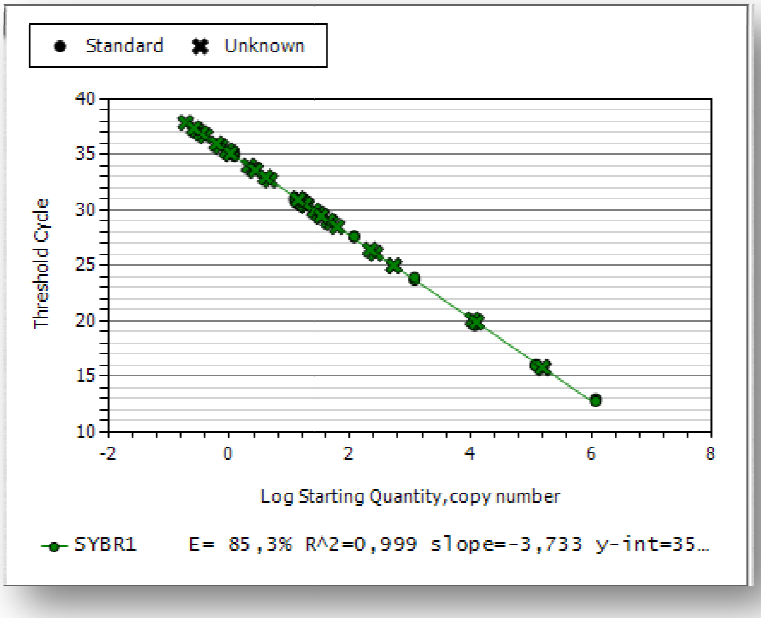


Figura nº 43 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*.

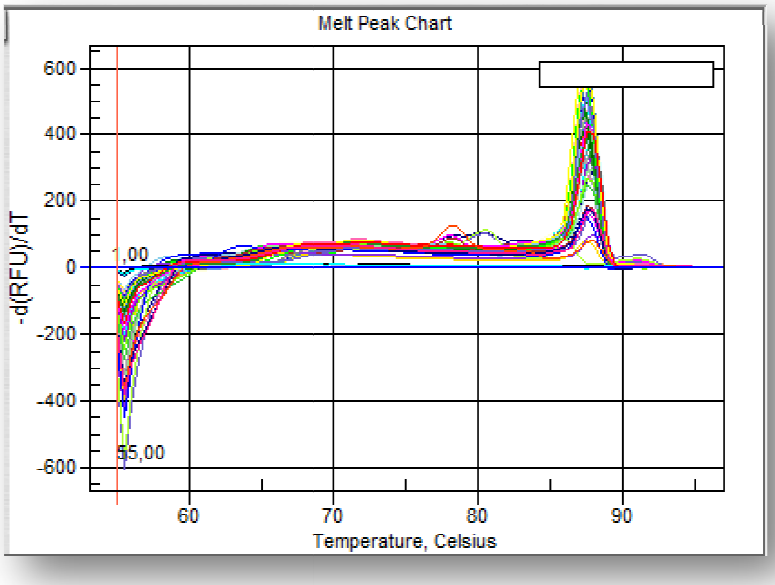


Figura nº 44 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *16S rRNA* específico de *Microcystis*.

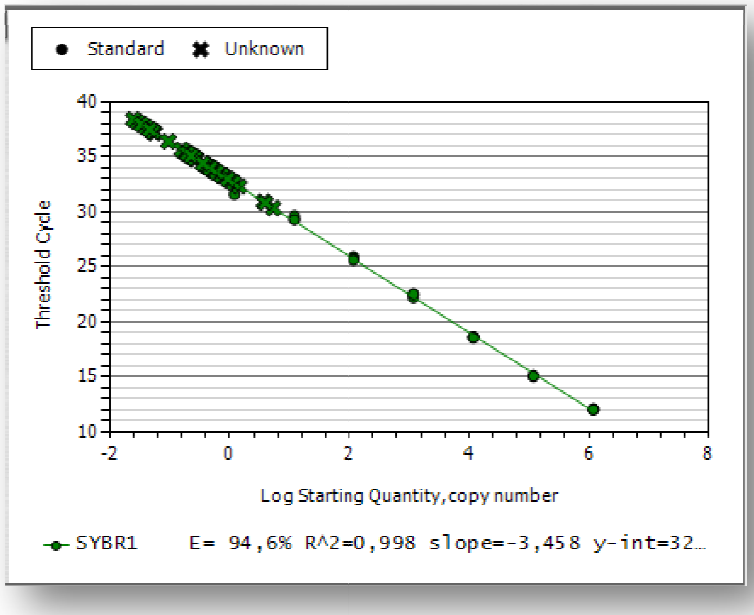


Figura nº 45 - Gráfico correspondente à curva padrão da amplificação por PCR em tempo real do gene *mcyA*.

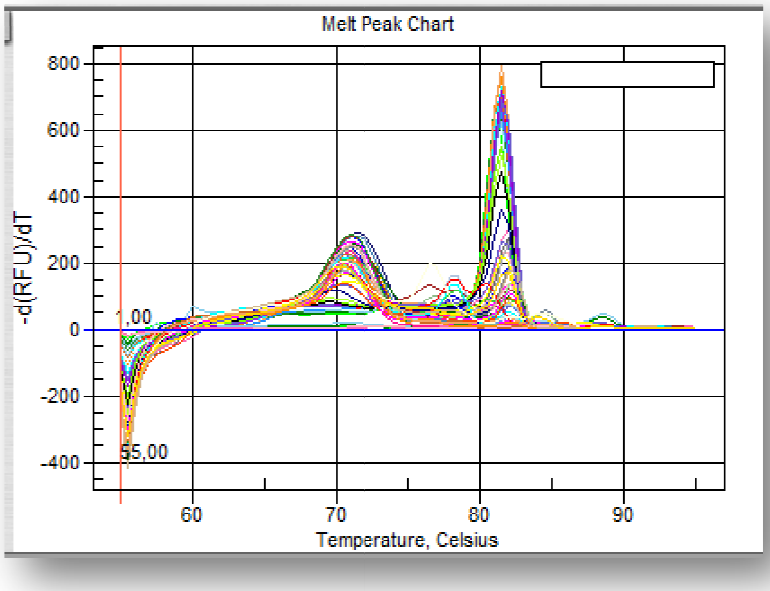


Figura nº 46 - Gráfico correspondente à temperatura de *Melting* e respectivos picos da amplificação por PCR em tempo real do gene *mcyA*.

Anexo 3 – Sequencias amplificadas das culturas isoladas através da amplificação do gene *16S rRNA.* As sequências estão no sentido 5'→3'.

Leptolyngbya sp. Mi 26-Jun 1447 pb

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGT
GGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAACATGCCTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATG
TGCCTTAGGGTGAAAGATTTATTGTCTAGAGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAG
GCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGACCAGGCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGT
AAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATGACGGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCTGTCAAA
GCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAGTGGAAACTGATGAACTAGAGTGCGATAGGGGTAACAGGAATTCCCAGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGGCGAAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTTGTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
TCCTCGGAACCCTGATGAAAGTTAGGGGTGCCTTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAG
AGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCCTTGGGCTACACA
CGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAGCCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCATAAACCGACGCTCAGTTCAGAT
TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGG
ACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAC

Leptolyngbya sp. Mi 26-Jun 1380 pb

GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGC
CCTTAGGAGGGGAACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATGCCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGTTATATCGCCTGAGG
ATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGAACTGA
CGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAATTAAGTCTGTTGTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAAT
GGAAACTGGTTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAG
AACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAG
ATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAGCTAACGC
GTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCTTCAGAGATGAGGGA
GTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGGACAACTCGGAGGA
AGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACAGACAGAGGGCA
GCGAGCGCGCGAGTGCAAGCAAATCCCATAAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
GCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCA

Leptolyngbya boryana Mi 26-Jun 1404 pb

TGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAAC
ATGCCTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTGAAAGATTTATTGTCTAG
AGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGA
TGACCAGGCACACTGGAACTGAAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATG
ACGGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAG
TGGAAACTGATGAACTAGAGTGCGATAGGGGTAACAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAG
AACACCAGCGGCGAAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAG
ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCCAACGC
GTTAAGTTGTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTCGGAACCCTGATGAAAGTTAGGGG
TGCCTTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAG
CCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCATAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGC
GGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
GGGAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGG
TGAAG

Geitlerinema carotinosum Mi 30-Jul 704 pb

CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTAACAAAACGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTT
AAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTTGCGAATCTCCTTGAAAGGGGAGAGTGC
CTTCGGGAGCGCAAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTCATGTTTAGTTGCCAATATTAAGTTAGGCACTCTAGACAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTAAGGACAAAGGGAAGCGA
AGCTGCGAAGTGAAGCAAATCCCATCAAACTTTACCACAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGG
AATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
AAGCTGGTCATGCCCGAAGTCGTTACCCTAACCATTCGTGGAGGGGGATGCCTAAGGCGGGGCTGGTGACTGGGGTG
AAGT

Geitlerinema carotinosum Mi 13-Ago 463 pb

GATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTAGCAATACTTAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAGCTTCAGGTTCGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCCAC
GGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCATCG
ATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAAGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCT
CTTTTCTCAGGGAATAAAAAAATGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA

Leptolyngbya frígida Mi 24-Set 707 pb

GACACTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGGTACTAG
GTGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTATGCACGCAAGTGT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCCCGGTGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCATCATTAAGT
TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTC
CTGGGCTACACACGTACTACAATGCTTCGGACAAAGGGTTGCGAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCGTAAACCGAGG
CTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGTGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCGC
TTGCGGA

Pseudanabaena tremula Mi 24-Set 1375 pb

GGCGGTTGCTTAACACATGCAGTCGAACGGTCTTTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTG
GCCTTAGGTTCGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTAAAAGCTTTAGTGCCTGAAG
ATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGATTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGAC
GGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGATGCAAGCGTTATCCGGATT
TATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGTGGTTATTCAAGTCTGCTGTTAAAGCGCGAGGCTTAACTTCGTACAGGCAGTGGA
AACTGGATGACTGGAGTATGGTAGGGGTAGCGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACA
CCAGCGGCGAAAGCGCGCTACTGGGCCATTACTGACACTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAC
CCCTGTAGTCCTAGCTGTAACGATGGGTACTAGGTGTTGACCGTATCGACCCGGTCACGTGCCGTAGCTAACGCGTTA
AGTACCCCGCCTGGGGAGTATGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGAGCTTGACATGTCGCGAATCCCGGTGAAAGTCGGGAGTG
CCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGCTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCACGTCATTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCATTATGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCCTGGGTTACACACGTACTACAATGCTTCGGACAAAGGGTTGC
GAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCCGTAAACCGAGGCTCAGTTCAGATTGCAGGTTGCAACTCGCGTGCATGATGGCG
GAATCGATAGTAATAGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
CGAGTTGGCCACGCCAGAAGTCGTTACTCCAACCTTTCGGCGAGGAGGATGCCG

Limnothrix redekei Mi 24-Set 1415 pb

GGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCT
GCCTTCAGGTCGGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGA
AGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGTGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGG
ACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGC
GAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCT
GACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGG
ATGGAAACTGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAA
GAACACCAGCAGCGAAGGCGTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTA
GATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACG
CGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG

GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGG
AGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGGACAGAGGG
CTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAA
GGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGGAGTTGGTTTTGCCCGAAGTCATTACCCTAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTGATGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAC

Geitlerinema carotinosum Mi 22-Out 1381 pb

TTTCTTATGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTTCGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTA
ATACCGGATGTGCCCACGGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA
GGCTTACCAAGGCATCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAAGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGG
CTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAAAAAATGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTACAACA
AGTCTAGTGTCAAAGACCGGGGCTTAACTCCGGGATGGCGGTGGAAACTGTTGAACTAGAGGGTCGTAGGGGTAGAG
GGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGACGGCAA
CTGACACTGAGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTA
GGTGTGGCTTGTAACAAAACGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAAGACTTGACATGTTGCGAATCTCCTTGAAAGGGGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCAAACACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCATGTTTAGTTGCCAATATTAAGT
TAGGCACTCTAGACAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTC
TTGGGCTACACACGTACTACAATGGTAAGGACAAAGGGAAGCGAAGCTGCGAAGTGAAGCAAATCCCATCAAACTTTA
CCACAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGT
GAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCATGCCCGAAGTCGTTACCCTAACCA
TTCGTGGAGGGGGATGCCTAAGGCGGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGC

Geitlerinema lemmermannii Mi 22-Out 756 pb

CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATTCTTCGGAATCTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGAGAATGCGCCACCAGGTCGGGGACAACATTGGAAACGAATGCTAATACCCGATGTGCCGCAA
GGTGAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGACTACCAAGGCGACGA
TCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTC
TTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACG
GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGAGTGG
AGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAACTGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCAGCGAAGGCGTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGACGAAAGCT
AGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACACTAG

Leptolyngbya sp. Mi 22-Out 725 pb

TGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAAATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTA
AGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCTCCTTGAAAGGGGAGAGTGCCTACGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCATCATTCA
GTTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCATACG
TTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTTTGGACAGAGAGTTGCCAACTCGCGAGAGTGAGCTAATCTCATAAACCAAG
GCACAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
CGCTTGTCGGAGGAGGACGCCGAAGG

Pseudanabaenaceae cyanobacterium V 26-Jun 1420 pb

TGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTTTGGGTACTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAG
GATCTGCCTACAGGACCGGGACAACAGATGGAAACGTCTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAACATTGTATGG
CCTGTAGAGGAGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTAA
GAGGATGAACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAAT
GGGGGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAA
GTACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTT
ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTGATTCAAGTCTTTTGTCAAAGAATGGAGCTCAACTCTGTATA

GGCGGAAGAAACTGAATTACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCT
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGG
GATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGGCGTATCGACCCGAGCAGTACCGAAGC
TAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCCTCGAATCATTGGGAAACC
GATGAGTGCCTTCGGGAGCGAGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTTCGGACAAA
GAGCAGCGAGCGCGCGAGTGCAAGCAAATCTCATAAACCGAGGCACAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
TGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT

Leptolyngbya sp. V 26-Jun 1404 pb

TGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAAC
ATGCCTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTGAAAGATTTATTGTCTAG
AGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGA
TGACCAGGCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATG
ACGGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAG
TGGAAACTGATGAACTAGAGTGCGATAGGGGTAACAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAG
AACACCAGCGGCGAAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAG
ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCCAACGC
GTTAAGTTGTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTCGGAACCCTGATGAAAGTTAGGGG
TGCCTTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAG
CCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCATAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGC
GGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
GGGAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGG
TGAAG

Geitlerinema amphibium V 26-Jun 757 pb

GCTTAACACATGCAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTACCTTTA
GGACGGGGACAACAATGGAAACGATTGCTAATACCCGATATGCCCTTCGGGGTGAAATGTTTTATCGCCTGAAGATGA
GCTCGCGTCCGATTAGCTAGTAGGTAGTGTAATGGACTACCTAGGCGATGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGC
CTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCCCTTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGG
TACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAGATAAGTCTGCTTTCAAAGAGTGGGGCTCAACCCCATAGGGGGAGTGGA
AACTGTTTAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGACCGAGACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA
CCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGAGCCGT

Leptolyngbya sp. V 26-Jun 1385 pb

CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAACATGC
CTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTGAAAGATTTATTGTCTAGAGAT
TGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGGCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAG
CCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATGACGG
TACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAGTGGAA
ACTGATGAACTAGAGTGCGATAGGGGTAACAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACAC
CAGCGGCGAAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
CCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAGCCGTGACACTGAGGGACGAAAG
CTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACC
CGAGCCGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTTGTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTC
GGAACCCTGATGAAAGTTAGGGGTGCCTTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCCTTGGGCTACACACGTAC
TACAATGCGTCGGACAAAGAGCAGCCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCATAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAG
GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCC
GAAGTGGGGCTGATGA

Leptolyngbya sp. V 30-Jul 1385 pb

TGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAT
CTGCCCTTAGGAGGGGAACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATGCCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGTTATATCGCCT
GAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAG
GATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGAA
CTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTTATTAAGTCTGTTGTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGG
CAATGGAAACTGGTTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGG
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGG
ATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAGCTA
ACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCTTCAGAGATGA
GGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGGACAACTCGG
AGGAAGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACAGACAGAG
GGCAGCGAGCGCGCGAGTGCAAGCAAATCCCATAAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT
GAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAG

Anabaena sp. V 30-Jul 1369 pb

CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCTTAGGATCTAGTGGCGGACGG
GTGAGTAACGCGTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGGAAG
GTGAAAGGCTTGTTGCCTGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGAGGGGTAAAAGCCCACCTAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCT
TTTCTCAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAATCA
CGCTCAACGTTGTCAAAGCAGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCT
AGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCG
AGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCG
AATCTTCCTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGGCACTCTAGAGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTA
CAATGCTACGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGC
TGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTA

Leptolyngbya sp. V 30-Jul 724 pb

TGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGGAACTA
GGTGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGGCTTGACATGTCCGGAACCTTGGTGAAAGCTGAGGGTGCCTTCGGGAACCGGAGCACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTCAGTTGCCATCATTAA
GTTGGGCACTTTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACG
TCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTGTGGACAAAGAGCTGCGAGCCGGCGACGGCAAGCCAATCTCATAAACCAC
GGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
ATTCGGGAGGGGGACGCCGAAGGCA

Leptolyngbya sp. V 13-Ago 750 pb

TGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGACACTA
GGTGTTGCGCGTATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGGTTTGACATCCCTCGAATCTCTGCGAAAGTGGAGAGTGCCTTCGGGAGCGAGGAGACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTCAGTTGCCAGCATTAA
GTTGGGGACTCTGGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACA
TCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGTTAGGACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCAAAACTCATAAACCTA
GCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCTAACC
GTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTGG

Leptolyngbya sp. V 13-Ago 759 pb

CTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGT
GAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGAACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATGCCCCATATGCCGAGAGG
TGAAAAGTTATATCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCT
TTTCTCTGGGAAGAAGAACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACG
GAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAATTAAGTCTGTTGTCAAAGGTCAC
AGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAAACTGGTTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAG
CTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACTGCAGTA

Geitlerinema amphibium V 24-Set 761 pb

CTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGG
GTGAGTAACGCGTGAGAATCTACCTTTAGGACGGGGACAACAATTGGAAACGATTGCTAATACCCGATATGCCCTTCG
GGGTGAAATGTTTTTTCGCCTAAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTAGGTAGTGTAATGGACTACCTAGGCGATG
ATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCC
CTTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAGATAAGTCTGCTTTCAAAGAGTG
GGGCTCAACCCCATAGGGGGAGTGGAAACTGTTTAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGACCGAGACTGACGCTGAGGGACGAAA
GCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGTATGACACTAGG

Leptolyngbya sp. V 24-Set 1376 pb

CGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAACATGC
CTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTGAAAGATTTATTGTCTAGAGAT
TGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGGCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAG
CCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATGACGG
TACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAGTGGAA
ACTGATGAACTAGAGTGCGATAGGGGTAACAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACAC
CAGCGGCGAAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
CCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCCAACGCGTTAA
GTTGTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTAT
GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTCGGAACCCTGATGAAAGTTAGGGGTGCC
TTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCACGTTTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
TGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAGCCAG
CCAGCGATGGTGAGCCAATCTCATAAACCGGCGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAA
TCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
GTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCCGAAG

Phormidium sp. V 24-Set 1341 pb

TCAGGATGAACGCGGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAGGAAGTCTTCGGAATTAGTGGCGGACGGGTGTAG
TAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGTCGGGGATAATTACTGGAAACGGTAGCTAATACCCGATGCGCCGAGAGGTGAA
AGGTTAATTGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTA
GCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
TTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCT
CAGGGAAGAAGTACTGACGGTACCTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGA
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTGTCGTTAAAGATCACAGCTCA
ACTCCGGGTCGGCGATGGAAACTGGAGAGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGG
GAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGAAGTATCCCGCCGGGGGAGTACGCACGCAAGTGT
GAAATTCAAAAGAATAGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTTCAGAGATGAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCATCATTAAGT
TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGGACAACACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTC
TTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCATAAACCGTGG
CTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGT
TCGCGGGGGAGGGCGCCGAAGG

Limnothrix redekei V 24-Set 1214 pb

CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTT
AAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTG
CCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGGACAGAGGGCTGC
AAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCGGGTAAAGCTGGCGTGTGCTTAA
CACATGCAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGG
GACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTC
CGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGTGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGACGGTACCTGAGGA
ATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGTCCGCAGGCGGTCTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAACTGCGAGAC
TAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCAGCGAA
GGCGTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGC

Aphanizomenon aphanizomenoides V 24-Set 499 pb

ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATCATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAA
CCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAG
AGCAAGGCTCAACCTTGTAAGAGCAGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGCAACTGACACTGAGGGACG
AAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCA

Anabaena sp. V 22-Out 1336 pb

CGAACGGGATCTTATGATCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCCGTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTG
GAAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGGAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAG
TAGGAGGGGTAAAAGCCCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGT
GAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGT
AGGTGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAATCACGCTCAACGTGATCAAAGCAGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCG
GTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTG
CTAGACCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAA
CGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTA
CGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGCAGAGACAG
GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGT
TGCCAGCATTAAGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGC
ATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACTCAGTGATGTGATGCAAATC
TCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCA
GCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCATGGGTCACGCCCGAAGTCATTACCCCAACC
GAAAGGAGGAGGATG

Geitlerinema amphibium V 22-Out 746 pb

GTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTACCTTTAGGACGGGGACAAC
AAATGGAAACGATTGCTAATACCCGATATGCCCTTCGGGGTGAAATGTTTTTTCGCCTAAAGATGAGCTCGCGTCCGAT
TAGCTAGTAGGTAGTGTAATGGACTACCTAGGCGATGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAATA
CCGCGTGGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCCCTTTTCTCAGGGAAGAAGCTCTGACGGTACCTGAGGAATAAG
CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT
CCGCAGGCGGCTAGATAAGTCTGCTTCAAAGAGTGGGCTCAACCCCATAGGGGGAGTGGAAACTGTTTAGCTAGAGTA
TGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCT
CTGCTGGACCGAGACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTG
TAAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGAGCCGTGC

Anabaena sp. V 22-Out 735 pb

CGGGATCTTAGGATCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATTTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAA
ACGACTGCTAATACCGGATATGCCGGAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATAAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAG
GAGGGGTAAAAGCCCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAG

GGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGG
TGGTACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAATCACGCTCAACGTGATCAAAGCAGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCGGTAG
GGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAG
ACCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAAATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGAT
GGATACTAAGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTG

Leptolyngbya frigida V 22-Out 735 pb

GACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGGTACTAG
GTGTTGACCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTATGCACGCAAGTGT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCTCCAGGAAAGGGGAGAGTGCCTACGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCATTCAG
TTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCATACGT
TCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTTTGGACAGAGAGTTGCCAACTCGCGAGAGTGAGCTAATCTCATAAACCAAGG
CACAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCGC
TTGCGGAGGAGGAGGACGCCGAAGG

Cylindrospermopsis raciborskii V 22-Out 1388 pb

CTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATGCTTAGGCATCTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCCAGGTCGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAG
AGGTGAAAGATTTATTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACCACCAAGGCGTCG
ATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCT
CTTTTCTCAAGGAAGAAGAAAGTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGGTGGAACTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGT
TTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCGGTAGGGGCAAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAG
CTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACC
CGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATCCTG
CGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACT
ACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAATCCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGG
CTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGG

Anexo 4 – Cromatograma correspondente à análise de amostras ambientais por HPLC.

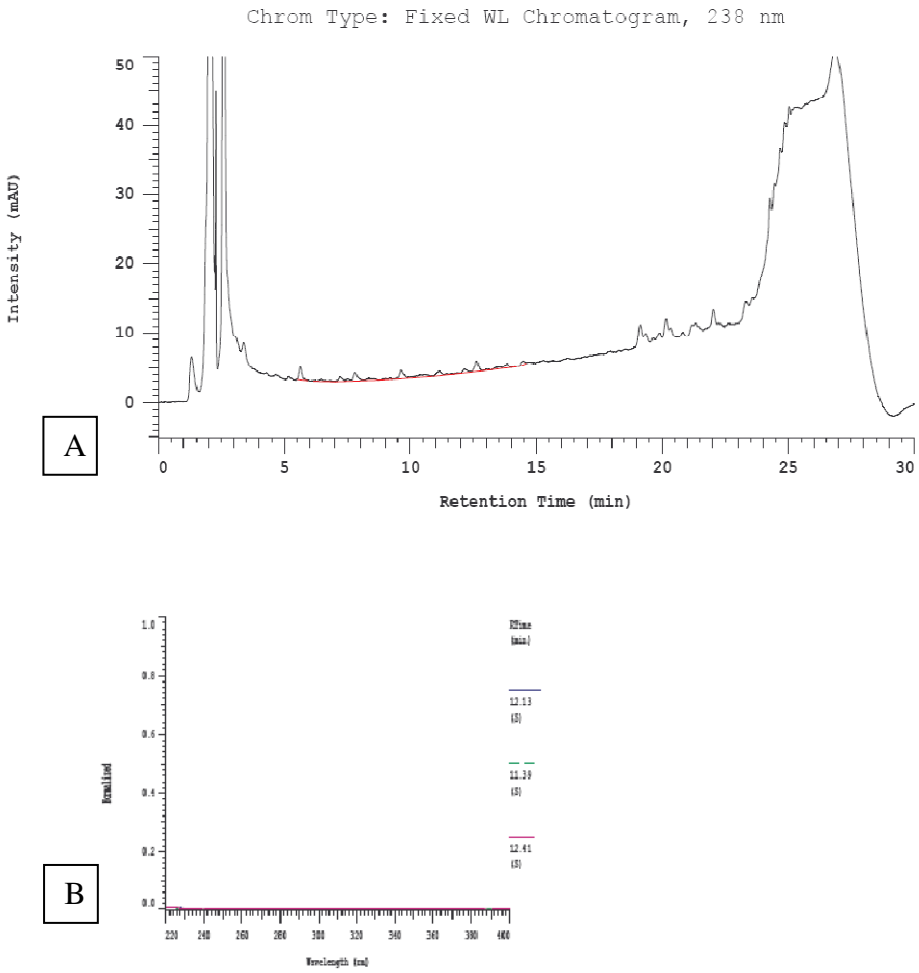


Figura nº 47 – A - Cromatograma da análise por HPLC da amostra ambiental V 30-Jul com um pequeno pico que corresponde ao tempo de retenção de microcistina-LR. B - Espectro de absorvância sem nenhum pico a 238 nm, que leva a concluir que não se trata de microcistina-LR.