

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Identificação de Espécies de Cianobactérias
potencialmente tóxicas, no reservatório de Alqueva por
PCR em Tempo Real e DNA barcoding**

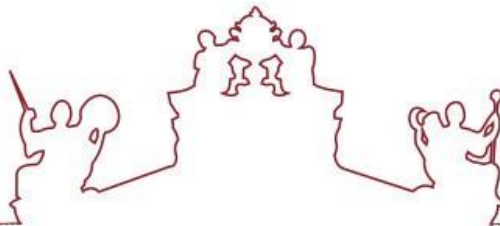
Inês Cristina Violante da Cruz Mavioso

Orientador(a) | Maria Alexandra Marchã Penha

Eduardo António Morales Luiziaga

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

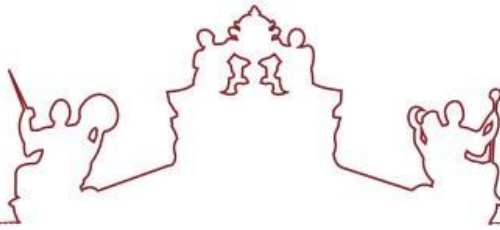
**Identificação de Espécies de Cianobactérias
potencialmente tóxicas, no reservatório de Alqueva por
PCR em Tempo Real e DNA barcoding**

Inês Cristina Violante da Cruz Mavioso

Orientador(a) | Maria Alexandra Marchã Penha

Eduardo António Morales Luiziaga

Évora 2020



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal | António Manuel Teixeira Martins do Canto (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Maria Alexandra Marchâ Penha (Universidade de Évora)

*Ao meu querido Pai,
Que nos voltemos a encontrar*

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer à Sr.^a Professora Doutora Manuela Morais pela oportunidade em me aceitar como colaboradora no Laboratório da Água, permitindo assim, que eu desenvolvesse um interesse em realizar este trabalho nessa mesma unidade de investigação.

À Alexandra Penha por me ter aceite como orientanda. Pelo companheirismo, pela paciência, dedicação, disponibilidade, pelo conhecimento que me transmitiu ao longo destes meses, mas principalmente, pela nossa amizade.

Ao Eduardo pela sua sabedoria prestada, pela sua disponibilidade constante e por me ter aceite como sua orientanda.

A todos os colegas do Laboratório da Água por me apoiarem nesta fase da minha vida: Maria Cordeiro, Marvin Freira, Ana Cláudia, Susana Nunes, Cristina Araújo, Maria Mira, Jéssica Carvalho e Maria Helena. Em especialmente à Anabela Rosado que me ensinou tudo o que sei sobre as técnicas físico-químicas e pela amizade que cresceu entre nós nestes dois anos.

À Maria Cordeiro, pela paciência incansável, pelo apoio que me prestou ao longo destes anos, por me ouvir, por nunca ter desistido de mim, por ser a minha maior motivadora e que acreditou sempre que eu iria ultrapassar os meus medos e desafios mais difíceis.

Ao Pedro Mairos pelo suporte emocional, pelo amor, por ser o meu melhor amigo, por me ter amparado sempre que precisei, em que só a sua presença chega para melhorar o meu dia. Um grande obrigado ao meu *Tiny Dancer*.

À minha tia/vizinha Maria do Rosário por ser como uma segunda mãe, por me ter guiado e ajudado sempre, por me ajudar a ver a vida noutra perspetiva e incentivar para ter um futuro melhor.

Ao Paco e à Sushi, porque também devemos agradecer à nossa família de quatro patas quando nos fazem companhia nas longas noites de estudo, por nos transmitirem uma calma contagiante e alegria constante e por serem os nossos parceiros para a vida.

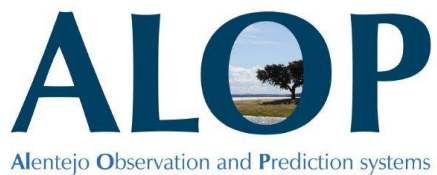
À minha mãe por me ter apoiado sempre e ser o meu porto seguro. Por me ter ajudado durante toda a minha vida e nunca ter desistido da minha educação e formação com os seus conselhos que só uma mãe sabe dar. Por ser a minha “bengala” na vida pessoal e profissional. Pelas nossas brigas, pelos nossos choros, pelas nossas gargalhadas, pelas nossas conversas, pelos nossos desabafos, pela tua presença constante e por sempre teres acreditado em mim. Um enorme obrigado!

Por último, um enorme agradecimento ao meu Pai, apesar de já não estar presente para ver este meu objetivo realizado, nunca desistiu de mim. Fez enormes esforços para nunca me faltar nada durante toda a minha vida pessoal e de aluna, sem ele não tinha chegado até onde cheguei. Pelo carinho enorme, pelo apoio, pelo amor incondicional. Felizmente tudo ficou dito e só tenho de dizer obrigada por tudo.

Obrigada a todos,

Inês Mavioso

Agradecimento Institucional



UNIVERSIDADE DE ÉVORA



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
LABORATÓRIO DA ÁGUA



Instituto de Ciências da Terra
Institute of Earth Sciences

Índice

<i>Agradecimentos</i>	V
<i>Agradecimento Institucional</i>	VII
Resumo.....	X
<i>Abstract</i>	XI
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas.....	XIV
Índice de Equações.....	XVI
Lista de Abreviaturas	XVII
Capítulo 1 – Enquadramento	15
1.1. Problemática.....	15
1.2. Alqueva – Local de Estudo	16
1.3. Objetivos	18
Capítulo 2 – Enquadramento Teórico	19
2.1. Eutrofização	19
2.2. As Cianobactérias.....	22
2.2.1. Características Morfológicas das Cianobactérias	22
2.2.2. Toxicidade das Cianobactérias	25
2.2.2.1. Neurotoxinas	27
2.2.2.2. <i>Hepatotoxinas</i>	27
2.2.2.3. <i>Dermatoxinas</i>	28
2.2.2.4. <i>Citotoxinas</i>	28
2.2.3. Características genéticas das Cianobactérias.....	29
2.2.4. Componente Físico-Química da Água	31
2.2.5. Componente Biológica – Clorofila <i>a</i>	32
2.2.6. Aplicações Biotecnológicas das Cianobactérias	33
2.2.7. As Cianotoxinas no Mundo e em Portugal.....	34
Capítulo 3 – Material e Métodos	36
3.1. Amostragem	36
3.2. Componente Físico-Química da Água	37
3.2.1. pH, Temperatura e Oxigénio Dissolvido (OD) <i>in situ</i>	38
3.2.2. Turbidez	38
3.2.3. Fósforo Total e Fosfatos.....	38
3.2.3.1. <i>Fósforo Total</i>	38

3.2.3.2.	<i>Fosfatos</i>	39
3.2.4.	Azoto Total, Nitritos, Nitratos.....	41
3.2.4.1.	<i>Azoto Total</i>	41
3.2.4.2.	<i>Nitritos</i>	42
3.2.4.3.	<i>Nitratos</i>	43
3.3.	Componente Biológica.....	44
3.3.1.	Clorofila <i>a</i>	44
3.4.	Determinação da Presença de Cianobactérias por Biologia Molecular.....	46
3.4.1.	Extração de DNA	46
3.4.2.	Determinação da Concentração de DNA	48
3.4.3.	Amplificação de DNA.....	49
3.5.	Análise Estatística	52
Capítulo 4 – Apresentação e Discussão de Resultados		53
4.1.	Variáveis Físico-Químicas da Água em Setembro de 2017	53
4.1.1.	Diferenças entre as Plataformas	53
4.1.2.	Correlação entre os Parâmetros Físico-Químicos nas Plataformas	56
4.2.	Variáveis Biológicas e Moleculares em Setembro de 2017	57
4.2.1.	Correlação entre os Parâmetros Biológicos e Moleculares nas Plataformas	61
4.2.2.	Correlação entre os Parâmetros Biológicos e Moleculares com os Parâmetros Físico-Químicos	61
Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras		63
Bibliografia		65

Resumo

As Cianobactérias são possivelmente os organismos procariotas fotossintéticos mais antigos existentes à face da Terra. O objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar e caracterizar um *bloom* de Microalgas, a nível espacial, em três locais diferentes da albufeira de Alqueva, e ao longo da coluna de água, a diferentes profundidades. Foram realizadas análises físico-químicas, biológicas e moleculares. Os resultados dos parâmetros físico-químicos mostram que a albufeira se encontrava em período de estratificação. A plataforma de Lucefécit foi a que apresentou valores superiores de Clorofila *a*, e Fósforo Total, ultrapassando os limites do Estado Trófico e a fronteira do Bom Potencial Ecológico. Em todos os locais foi detetada a presença de Cianobactérias, com presença do gene 16S rRNA específico para este grupo. Apenas em Lucefécit não se verificaram genes responsáveis pela produção de Microcistinas, ao contrário dos outros locais, onde se observaram em toda a coluna de água.

Palavras-chave: Toxicidade, Cianotoxinas, Biologia Molecular, Clorofila *a*, Físico-Química

Abstract

Identification of potentially toxic Cyanobacteria species by Real Time – PCR and DNA barcoding

Cyanobacteria are possibly the oldest photosynthetic prokaryotic organisms on Earth. The main objective of this work was to study and characterize a spatial microalgae bloom at three different locations of the Alqueva reservoir, and along the water column at different depths. Physicochemical, biological and molecular analyzes were performed. The results of the physicochemical parameters showed that the reservoir was in stratification period. The Lucefécit platform presented the highest values of Chlorophyll *a*, and Total Phosphorus, surpassing the limits of the Trophic State and the boundary of Good Ecological Potential. Cyanobacteria were detected at all sites, with 16S rRNA gene specific for this group. Only in Lucefécit there were no genes responsible for the production of Microcystins, contrasting the other places, where they were observed throughout the water column.

Keywords: Toxicity, Cyanotoxins, Molecular Biology, Chlorophyll *a*, Physicochemical

Índice de Figuras

Figura 1 - Alqueva e as Plataformas de Monitorização onde foram realizadas as amostragens. Retirado de Google Maps	16
Figura 2 - Alqueva e as Plataformas de Monitorização onde foram realizadas as amostragens	16
Figura 3 - Representação esquemática que compara a estrutura celular das Cianobactérias com as células das bactérias Gram-positivos e Gram-negativos. Retirado e adaptado de: (Sciuto & Moro, 2015)	23
Figura 4 - Exemplo da representação de componentes celulares presentes em algumas espécies de Cianobactérias. A - Acinetos e H - Heterocistos. Retirado e adaptado de: gr(Moreno, et al., 2012).....	25
Figura 5 – Exemplos de algumas estruturas químicas das principais cianotoxinas estudadas a nível mundial. Retirado de: (Bortoli & Pinto, 2015)	26
Figura 6 - Cluster correspondentes aos genes <i>mcy</i> e <i>nda</i> produzida pela <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806 e pela <i>Nodularina spumigena</i> NSOR10, respetivamente [Adaptado de: (Rastogi, et al., 2015)].	30
Figura 7 - Exemplo da representação gráfica da amplificação obtida após toda a corrida do PCR em tempo real (Microbial, 2009)	51
Figura 8 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos Temperatura (°C) (A) e o pH (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo	54
Figura 9 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos Condutividade (A), Turbidez (B) e Oxigénio Dissolvido (C). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo	54
Figura 10 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos dos compostos azotados, Nitratos (A), Nitritos (B) e Azoto Total (C). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo	55
Figura 11 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos dos Fosfatos (A) e Fósforo Total (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo	55

Figura 12 - Representação gráfica dos parâmetros Biológico e Molecular, a Clorofila *a* (A) e a Concentração do DNA (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo 58

Figura 13 - Representação gráfica do parâmetro Molecular, 16S Ciano. O parâmetro está representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo..... 59

Figura 14 - Representação gráfica da evolução dos genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyE/nda* ao longo da profundidade em Lucefécit (A) e Mourão (B)..... 60

Figura 15 - Representação gráfica da evolução dos genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyE/nda* ao longo da profundidade em Montante..... 60

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Alguns exemplos das cianotoxinas e as suas características mais importantes que têm vindo a ser estudadas com mais frequência. Retirado e adaptado de: (Newcombe, et al., 2010; Fernandes, 2009).....	29
Tabela 2 - Representação do local da amostragem, da descrição das campanhas realizadas e os perfis analisadas em laboratório	36
Tabela 3 - Valores Máximos Recomendados e Admissíveis, segundo o Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto na qual se rege o Sector de Físico-Química do Laboratório da Água da Universidade de Évora	37
Tabela 4 - Informação dos Primers que foram utilizados na amplificação de cada um dos genes alvo	46
Tabela 5 - Mistura Primária preparada segundo o protocolo do kit BIORAD – iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	50
Tabela 6 - Resultados dos parâmetros Físico-Químicos [Mediana (mínimo- máximo)], nas diferentes plataformas ao longo das campanhas, assim como valores de p resultantes do teste Kruskal-Wallis (* p<0,05). Os valores a negrito representam os valores medianos mais elevados e, na coluna das Diferença entre Plataformas, as diferenças significativas) (n=21)	53
Tabela 7 - Correlação entre todos os parâmetros Físico-Químicos em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos.....	57
Tabela 8 - Resultados dos parâmetros Biológicos e Moleculares [Mediana (mínimo-máximo)], nas diferentes plataformas ao longo das campanhas, assim como valores de p resultantes do teste Kruskal-Wallis (* p<0,05). Os valores a negrito representam os valores medianos mais elevados e, na coluna das Diferença entre Plataformas, as diferenças significativas) (n=21)	58
Tabela 9 - Correlação entre todos os parâmetros Biológicos e Moleculares em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação	

Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos..... 61

Tabela 10 - Correlação entre os parâmetros Biológicos e Moleculares com os parâmetros Físico-Químicos da água em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos..... 62

Índice de Equações

Equação 1 - Determinação da concentração da Clorofila <i>a</i> pelo cálculo proposto por Jeffrey e Humphrey	45
Equação 2 - Determinação da concentração do DNA extraído das amostras de água..	48
Equação 3 - Determinação da concentração de DNA com a correção a partir dos valores resultantes das leituras com as absorvâncias de 230 nm e 320 nm	49
Equação 4 - Equação de expressão relativa.....	52

Lista de Abreviaturas

ATP - Adenosina Trifosfato

BMAA - β -N-metilamino-L-alanina

BSA - Albumina de Soro Bovino

Ct - *Cycle threshold*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

[DNA] – Concentração de DNA total

DQA - Diretiva Quadro da Água

EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EFMA - Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

ICT – Instituto de Ciências e Tecnologia

IPBeja – Instituto Politécnico de Beja

L – Litro

Mb – Mega Par de Bases

mcy – *Cyanobacterial microcystin synthetase*

N – Azoto

NaOH – Hidróxido de Sódio

NO_2^- – Nitrito

NO_3^- - Nitrato

NTU - Unidade Nefelométrica da Turbidez

OD (apenas na Equação 2) – *Optical Density*

OD – Oxigénio Dissolvido

P - Fósforo

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PO_4^{3-} – Fosfato

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossómico

rpm – Rotações por Minuto

UE – Universidade de Évora

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo Recomendável

Capítulo 1 – Enquadramento

1.1. Problemática

As Cianobactérias são consideradas grupo do fitoplâncton mais antigo do planeta e que formam *blooms* em reservatórios naturais (O'Neil, et al., 2011). O facto das ocorrências das Cianobactérias estarem a aumentar bem como a possibilidade de serem libertadas toxinas para os sistemas de água doce têm despertado cada vez mais interesse nesta área. Por isso, a deteção e monitorização das Cianobactérias são necessárias para identificar e enumerar as espécies que podem produzir toxinas que colocam um risco para a saúde pública.

Estudos recentes sugerem que a eutrofização e as alterações climáticas são dois processos que promovem a proliferação e expansão dos *blooms* de cianobactérias (O'Neil, et al., 2011). O local de estudo deste trabalho é uma zona onde tem havido cada vez mais um aumento das atividades agrícolas, como por exemplo a plantação de olival intensivo e vinha, com o uso de fertilizantes, que aos poucos levam a um aumento no aporte de nutrientes principalmente fósforo e azoto nas massas de água. O excesso deste tipo de nutrientes num ambiente aquático, tem uma proporção e velocidade maior caso seja uma atividade artificial, neste caso, atividade antropogénica. No entanto, juntamente com outros fatores que também estão a piorar face às alterações climáticas, tem-se notado numa rápida multiplicação na formação de *blooms* que se apresentam como um agregado de organismos que podem ser, ou não, produtores de toxinas.

Por isso, a partir da ciência, tal como as Cianobactérias, temos de estar em constante alteração e adaptação no que toca ao estudo destes seres potencialmente tóxicos, e como é que esses estudos irão permitir a monitorização das massas de água, que estão em contacto com diversas formas de vida.

1.2. Alqueva – Local de Estudo

Com o seu projeto iniciado em 1968 e concluído em 8 de Março de 2002, situado no curso principal do Rio Guadiana, nasceu o maior lago artificial da Europa – o Alqueva (Ferreira, 2012) – estendendo-se por 83 km e ocupando uma área de 250 km² ao longo dos concelhos de Moura, Portel, Mourão, Reguengos de Monsaraz e Alandroal (Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva, S.A., 2019).

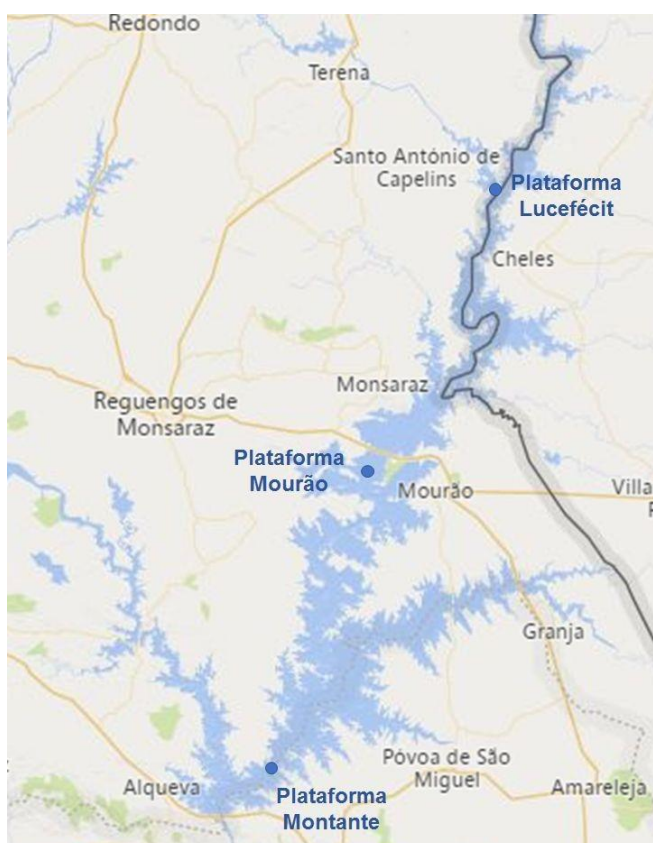


Figura 1 - Alqueva e as Plataformas de Monitorização onde foram realizadas as amostragens. Retirado de Google Maps

Com o projeto Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva (EFMA), no desenvolvimento do recurso de água, é possível investir no futuro da região a Sul de Portugal a partir das infraestruturas Barragem Mãe de Alqueva, da Central Hidroelétrica de Alqueva, da Barragem de Pedrogão, da Central Mini Hídrica de Pedrógão e do Sistema Global de Rega de modo a viabilizar a questão socioeconómica de uma região que é considerada a mais desfavorecida de Portugal.

Sendo assim, é possível fornecer condições de abastecimento regular urbano-industrial de todos os concelhos circundantes, bem como retardar os efeitos das secas prolongadas, produção de energia hidroelétrica, instalação de novos regadios e atividades recreativas (Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva, S.A., 2019; Fragoso, et al., 2008).

Por isso, devido à sua extrema importância e diversas dinâmicas na utilização da sua extensa massa de água, existem imensos estudos, com os mais variados temas, e este trabalho não é exceção. Aqui serão apresentados resultados Físico-Químicos e de Biologia Molecular da campanha de setembro de 2017, onde se observou um *bloom* de Microalgas. O objetivo deste trabalho é fazer uma caracterização físico-química,

biológica e molecular do *bloom* em profundidade e a nível espacial. Foram retiradas amostras de três locais: Plataformas de Luceférit, Mourão e Montante Em cada um destes locais, foram recolhidas amostras a sete profundidades:

- ✓ À Superfície da Albufeira (Sup.);
- ✓ A 1 metro da Superfície da Albufeira (1m);
- ✓ A 2 metros da Superfície da Albufeira (2m);
- ✓ A 3 metros da Superfície da Albufeira (3m);
- ✓ No Fim da Zona Eufótica da Albufeira (Fim Z.E.);
- ✓ No Meio da Albufeira (Meio);
- ✓ No Fundo da Albufeira (Fundo).

1.3. Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido a partir do Projeto ALOP (ALT20-03-0145-FEDER-000004), cuja equipa é composta por variados integrantes da Universidade de Évora (UE), IPBeja e ICT. O Projeto ALOP tem como finalidade contemplar e desenvolver ferramentas para os sistemas de observação, para a previsão e para alertas de situações de risco na atmosfera e reservatórios de água do Alentejo (Salgado & Barrenho, 2017).

Assim, com este projeto, foi possível selecionar e determinar objetivos para o corrente trabalho sendo o principal a identificação da presença de Cianobactérias que estão associadas a genes produtores de toxinas, a partir de amostras de água da albufeira de Alqueva. Este objetivo irá ser concretizado a partir da análise de parâmetros físico-químicos onde esperamos entender melhor o estado das massas de água e como poderá ter influência nas Cianobactérias.

Para completar a informação sobre o potencial ecológico da massa de água e para prever a presença das Cianobactérias, para além dos parâmetros físico-químicos de suporte, também se determinou a concentrações de clorofila *a* presentes nas amostras.

Para concluir os objetivos propostos efetuou-se o estudo mais específico para a identificação das Cianobactérias produtoras de toxinas a partir da técnica de Biologia molecular da reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Apesar de serem conhecidos géneros de Cianobactérias potencialmente produtores de toxinas pertencentes a várias ordens, este trabalho focar-se-á apenas na ordem das Microcistinas (*mcy*), uma vez que é uma toxina produzida por vários géneros de Cianobactérias.

Capítulo 2 – Enquadramento Teórico

2.1. Eutrofização

A água não é um produto comercial como outro qualquer, mas um património que deve ser protegido, defendido e tratado como tal – esta afirmação pode ser encontrada na Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000, conhecida como a Diretiva Quadro da Água (DQA). Como o documento político europeu indica, a água é um bem essencial à vida de todos os seres vivos sendo vital a sua preservação sustentável e cuidado, por isso, foi estabelecido um programa de ação de modo a proteger e realizar uma gestão adequada de todos os recursos de águas doces em todas as comunidades (Macário, et al., 2016; Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2000). Esta gestão é considerada um desafio para certos países uma vez que a obtenção de água potável, bem como a sua qualidade nas composições físico-química e microbiológica, muitas vezes não são indicadas para o abastecimento de consumo humano (Ferrão-Filho, et al., 2014; Petcheneshsky, et al., 2011). Mais frequentemente tem-se discutido que a possível principal causa que compromete a qualidade da água é um processo denominado por eutrofização. Este processo natural decorre ao longo de milhares de anos e sucede maioritariamente em ecossistemas aquáticos lênticos (lagos ou lagoas), onde a capacidade de renovação das águas é muito baixa. A sua definição combina-se com uma resposta biológica do enriquecimento e armazenamento das águas por nutrientes, cujos compostos maioritários são o azoto e o fósforo, com acumulação da matéria orgânica e diminuição do oxigénio, tendo como consequência a diminuição da quantidade de água presente na rede hidrográfica e a modificação de todo o equilíbrio natural do ecossistema aquático (Oliveira, et al., 2010).

Todavia, esta demanda natural tem vindo a aumentar devido à ação antropogénica que tem tido um aumento ao longo dos últimos anos levando à formação de massas de água eutróficas e, até mesmo, hipertróficas. O progresso da eutrofização artificial tem uma taxa de aceleração cada vez mais rápida devido à influência de vários fatores que são consequência da atividade humana. Os fatores principais podem ser:

- a) A elevada concentração na descarga de efluentes domésticos, urbanos e industriais. Uma vez que os esgotos contêm compostos de azoto e fósforo

provenientes das fezes, urina, detergentes e outros subprodutos, a drenagem urbana e o tratamento inadequados são cada vez mais difíceis de gerir devido ao aumento da contribuição de azoto e fósforo;

- b) A libertação e lixiviação de fertilizantes e pesticidas que se difundem nos solos provenientes das atividades agrícolas;
- c) A incorreta utilização da água das albufeiras (Vasconcelos, 1995).

Todos estes fatores agravados têm uma contribuição favorável que promove o desenvolvimento e a sucessão mais rápida de determinados grupos de espécies dominantes na comunidade do fitoplâncton (Ferrão-Filho, et al., 2014; Vasconcelos, 1995). Um dos grupos do fitoplâncton, mais predominante com todos estes fatores, são as Cianobactérias, que não conseguem ser ingeridas nem utilizadas pela comunidade do zooplâncton devido à reduzida taxa de reprodução deste e, também, devido à quantidade das Cianobactérias ser maior (Vasconcelos, 1995). Para além dos fatores antropogénicos, a sua capacidade de domínio advém de fatores naturais que são cada vez mais afetados pelas alterações climáticas (O'Neil, et al., 2011) que podem ser visíveis como uma proliferação excessiva a partir de:

- a) Fluorescências ou *Blooms* – As Cianobactérias estão presentes à superfície das massas de água, constituindo uma massa densa, em virtude da sua habilidade de flutuação;
- b) Espuma ou *Scum* – Juntamente com a flutuação das Cianobactérias, o facto de não haver a mistura das massas de água leva ao desenvolvimento de espumas de espécies de plâncton. Para além disso, apresentam uma elevada concentração de clorofila *a*.
- c) Tapetes ou Biofilmes – Ocorre em superfícies rochosas e na superfície de sedimentos em massas de água muito rasas (Carvalho, et al., 2013; Codd, et al., 2005).

A intensificação da luz solar, aumento da temperatura da água, aumento das concentrações de dióxido de carbono na atmosfera, diminuição dos níveis de pH e iões de carbonato e, inclusive, a presença de salinidade (O'Neil, et al., 2011) são os fatores naturais maioritários que promovem o desenvolvimento dominante das Cianobactérias.

A quantidade excessiva destes organismos impossibilita a entrada de luz necessária aos organismos presentes em níveis de água mais fundos e diminui a quantidade de oxigénio. Por isso, ocorre a morte destes organismos levando a uma nova proliferação de bactérias decompositoras. Sendo assim, as consequências geradas pela deposição contínua e enriquecimento de nutrientes (Rastogi, et al., 2015), que caracteriza a eutrofização antropogénica, e pelas alterações climáticas irá ter efeitos no equilíbrio e estabilidade natural de toda a vida presente nos ecossistemas aquáticos, desde o ser na base da cadeia trófica alimentar até ao ser presente no seu topo.

2.2. As Cianobactérias

Foi em 1838 que Ehrenberg identificou, pela primeira vez na história da ciência, as Cianobactérias (Ehrenberg, 1838). Mais tarde, em 1875, Thuret iniciou o primeiro estudo taxonómico das Cianobactérias. Desde então, que se tem discutido a correta organização taxonómica destes organismos uma vez que têm determinadas características morfológicas, bioquímicas, moleculares e genéticas, semelhantes aos organismos pertencentes ao grupo das Microalgas e ao grupo bacteriológico (Gomes, 2013). Em 1878, George Francis, da Austrália, descreveu pela primeira vez os potenciais perigos que se podiam tornar letais para a saúde humana, provocados pelas Cianobactérias, após se ter descoberto envenenamento de gado após o consumo de um lago contaminado (Carmichael, 1994; Regueiras, 2009; Francis, 1878). Embora possam ter determinadas estruturas semelhantes às bactérias, não possuem algumas estruturas como a membrana celular, as mitocôndrias ou cloroplastos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vacúolos, elas diferenciam-se destas uma vez que possuem um pigmento comum nas algas. Sendo assim, estrutural e fisiologicamente, as Cianobactérias são como as bactérias, mas funcionalmente são semelhantes às algas (Brandão, 2008).

Segundo alguns autores, que estudam toda a biologia e ecologia das Cianobactérias, afirmam que este grupo de microrganismos ancestrais, a partir de registos geológicos, paleontológicos e geoquímicos isotópicos, foram os responsáveis pelo aparecimento do oxigénio na Terra acerca de 3,5 mil milhões de anos. Sendo assim, foi possível a acumulação do oxigénio na atmosfera e a formação da camada de ozono na estratosfera. Uma vez desenvolvida esta camada protetora, a radiação ultravioleta que incidia sob o nosso planeta diminuiu, permitindo a evolução de novas espécies na terra e na superfície de lagos e oceanos. Outra vantagem consequente do aparecimento do oxigénio foi no aumento da produção de energia extraída da molécula de glucose por oxidação por parte dos seres que realizam respiração aeróbia. Desta forma, foi possível o desenvolvimento de organismos mais complexos, bem como, o surgimento de cadeias alimentares maiores (Halpern & Quintas, 2008; Gomes, 2013).

2.2.1. Características Morfológicas das Cianobactérias

As Cianobactérias a nível morfológico são relativamente simples, ou seja, podem-se apresentar na forma unicelular, multicelular, filamentosas e filamentosas ramificadas,

que pertencem ao Reino da Eubacteria e à divisão *Cyanobacteria* (Gomes, 2013; Brandão, 2008; Cheung, et al., 2013).

- a) São consideradas microrganismos procariotas (Siqueira & Oliveira-Filho, 2008);
- b) Diazotróficas, isto é, têm a capacidade de captar e usar diretamente o azoto atmosférico sob condições anaeróbias (O'Neil, et al., 2011);
- c) São Gram-negativas, onde as suas paredes celulares possuem um complexo – peptidoglicano – semelhante ao das bactérias, mas, com uma espessura mais grossa, que consiste numa proteção porosa presente nas células que as impede de sofrer plasmólise enquanto ocorre a entrada de alimento e saída de subprodutos (Fig.1) (Quintas, 2008; Sciuto & Moro, 2015);
- d) São autotróficas, permitindo-lhes a realização de fotossíntese aeróbia, proporcionando um incremento do desenvolvimento da sua biomassa num curto espaço de tempo (Oliveira, et al., 2010; Silva, 2012);
- e) A sua reprodução é exclusivamente assexuada por fissão binária ou fissão múltipla (Brandão, 2008).

Para além destas suas características, também são consideradas organismos ubíquos, devido à grande versatilidade morfológica e funcionalidades celulares, consequência da sua longa história de evolução, conferindo-lhes a capacidade de desenvolver adaptações e estratégias que as permite colonizar todo o tipo de ecossistemas naturais, bem como garantir a sua sobrevivência e domínio nos meios onde está presente (Oliveira, et al., 2010; Paerl & Paul, 2012; Sant'Anna, et al., 2008).

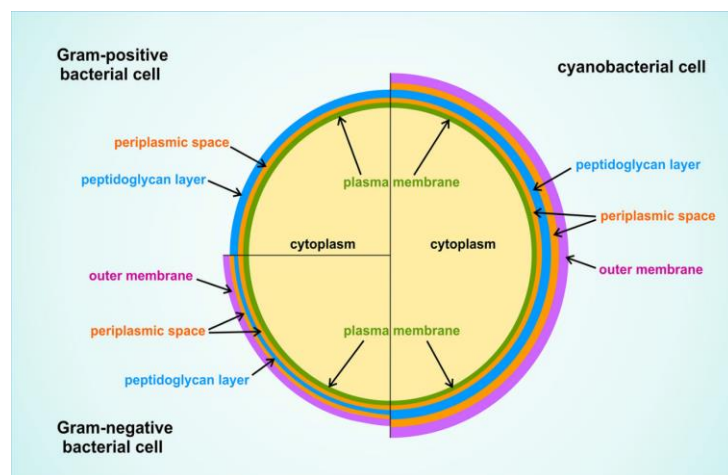


Figura 3 - Representação esquemática que compara a estrutura celular das Cianobactérias com as células das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Retirado e adaptado de: (Sciuto & Moro, 2015)

As Cianobactérias também têm a habilidade de armazenar nutrientes e metabolitos no citoplasma que lhes são essenciais à sua sobrevivência. De entre inúmeras espécies de Cianobactérias, existem algumas que diferenciam uma pequena porção das suas células na formação de heterocistos. Os heterocistos são células de paredes glicolípídicas espessas que têm como função a assimilação do azoto atmosférico a partir do complexo enzimático nitrogenase. Para além disso, também estão aptas para, estruturalmente e funcionalmente, proteger esse complexo que pode ser inibido irreversivelmente pelo oxigénio que é obtido na água (Oliveira, et al., 2013; Valério, 2008; Fernandes, 2009; Sciuto & Moro, 2015; Quintas, 2008). De modo a satisfazer a demanda pelo azoto, as Cianobactérias conseguem crescer e desenvolver-se a partir de uma grande variedade de fontes de azoto, como os nitritos, nitratos, ureia, aminoácidos, entre outros, mas, antes destes compostos poderem ser assimilados pelo organismo é necessário que sejam convertidos em amónia. O complexo enzimático nitrogenase presente nos heterocistos é constituído por duas subunidades. A primeira subunidade – dinitrogenase – catalisa a redução do azoto em amónia, enquanto a segunda subunidade – dinitrogenase reductase – tem como função doar eletrões à dinitrogenase. O ATP e a redução do azoto atmosférico são gerados no metabolismo dos heterocistos (Berg & Sutula, 2015).

Em condições adversas e extremas, as Cianobactérias conseguem diferenciar outras células especializadas, os acinetos. São células de resistência esporolisadas, caracterizadas por uma célula espessa e por um envelope extracelular de múltiplas camadas. Permitem o armazenamento de proteínas garantindo a sua sobrevivência, até as condições se tornarem favoráveis novamente para o seu desenvolvimento germinando-se em células vegetativas (Gomes, 2013; Sciuto & Moro, 2015; Oliveira, et al., 2010; Brandão, 2008). Adicionalmente, estas células desenvolvem vesículas gasosas, os aerotopos, o que permite às Cianobactérias uma migração rápida e vertical pela coluna de água. Desta forma, conseguem explorar em mais profundidade águas ricas em nutrientes ao mesmo tempo que aproveitam as condições ricas à superfície (Brandão, 2008; Paerl & Paul, 2012).

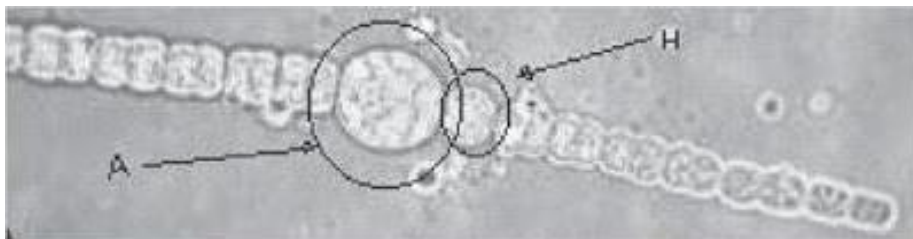


Figura 4 - Exemplo da representação de componentes celulares presentes em algumas espécies de Cianobactérias. A - Acinetos e H - Heterocistos. Retirado e adaptado de: (Moreno, et al., 2012)

2.2.2. Toxicidade das Cianobactérias

As Cianobactérias têm a capacidade de sintetizarem metabolitos secundários, provocando sabores e odores desagradáveis, que consistem numa ampla variedade de toxinas denominadas por cianotoxinas. (Svrcek & Smith, 2004; Apeldoorn, et al., 2007; Ibelings & Chorus, 2007; International Joint Commission by the Health Professionals Advisory Board, 2017). Apesar de serem compostos secundários, ou seja, não são utilizados para as funcionalidades primárias do metabolismo como a divisão celular, ainda não foi descoberto o motivo pela qual as cianotoxinas fazem as suas próprias toxinas. Alguns autores referem que beneficiam as Cianobactérias ao funcionar como mecanismo de defesa contra predadores, enquanto outros sugerem que servem para auxiliar na captação da radiação solar e nutrientes (Bortoli & Pinto, 2015; Carmichael, 1992). Estes metabolitos tóxicos são altamente prejudiciais na sobrevivência de vários organismos como os animais selvagens, domésticos e Humanos. A exposição destas toxinas pode ocorrer diretamente a partir do contacto dérmico, ou pela ingestão de água contaminada ou acidental a partir de atividades recreativas. Também existe a exposição indireta que ocorre pelo consumo de alimentos que estejam contaminados, como peixes e/ou bivalves, que são considerados vetores de toxinas para os níveis da cadeia trófica superior (Carmichael & Boyer, 2016).

Uma determinada espécie de Cianobactérias pode sintetizar mais do que uma toxina, e dentro dessa espécie, existem estirpes que podem ser, ou não, produtoras de toxinas. Normalmente, as Cianobactérias produtoras de toxinas estão distribuídas em aglomerados de fluorescências, *blooms* como já foi referido anteriormente. Estes blooms de Cianobactérias produtoras de toxinas são comumente denominadas por *cyanoHab*.

As cianotoxinas podem ser divididas segundo a sua estrutura química e pelos seus efeitos toxicológicos primários (Tabela 1) (Carmichael & Boyer, 2016; Oliveira, et al., 2010; Codd, et al., 2005). Segundo a sua estrutura química elas são divididas em:

- Péptidos Cíclicos:** São as formas mais comuns das cianotoxinas, é o exemplo das microcistinas e nodularinas (Fig. 3). Têm uma dimensão relativamente pequena, entre 80 a 1100 Da, têm uma natureza hidrofílica e são sintetizadas pelo péptido sintetase (Sharma, et al., 2011). Provocam impactos negativos, uma vez que conseguem promover o desenvolvimento de tumores, maioritariamente a nível do fígado, por inibirem as proteínas fosfatases P1A e P2A.
- Alcalóides:** Dentro deste grupo são encontradas as neurotoxinas, citotoxinas e dermatoxinas.
- Lipopolissacarídeos:** Estes componentes estão integrados na parede celular das células das Cianobactérias onde formam complexos com as proteínas e fosfolípidos (Sharma, et al., 2011).

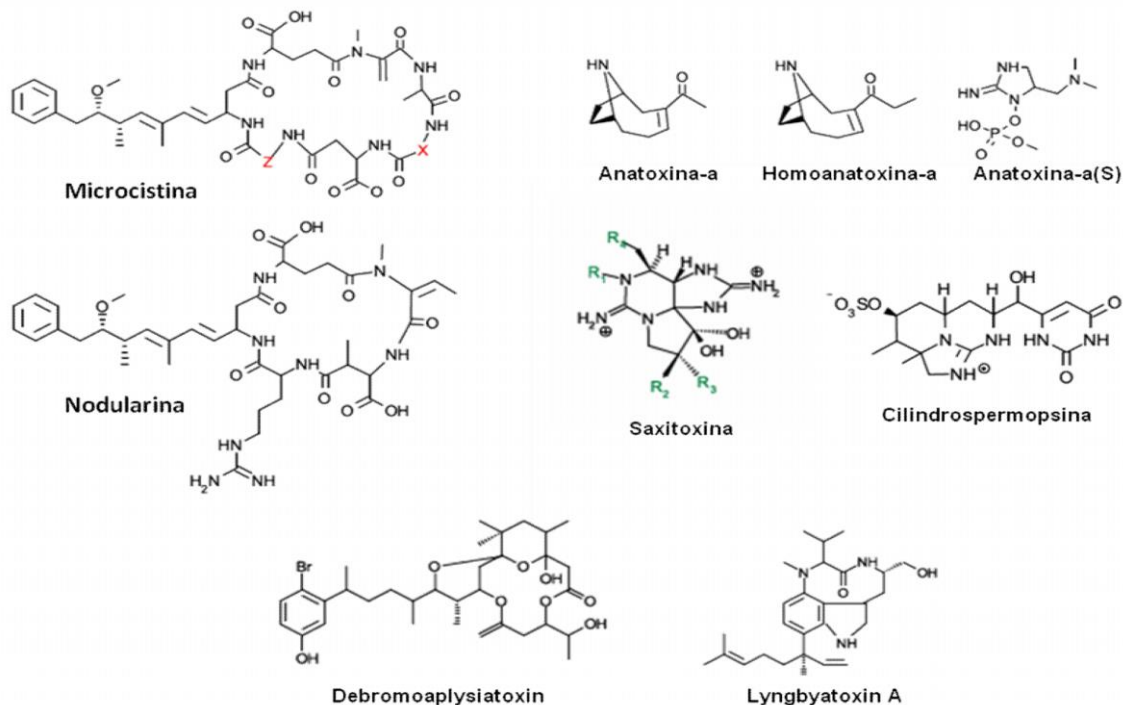


Figura 5 – Exemplos de algumas estruturas químicas das principais cianotoxinas estudadas a nível mundial. Retirado de: (Bortoli & Pinto, 2015)

Se forem caracterizadas segundo o seu mecanismo e efeitos de toxicidade, são divididas em Hepatotoxinas, Neurotoxinas, Citotoxinas e Dermatotoxinas.

2.2.2.1. Neurotoxinas

A nível de impactos de saúde em animais e humanos, estas cianotoxinas atuam ao longo de todo o sistema nervoso. Provocam uma interrupção na propagação normal dos impulsos nervosos e, como consequência, ocorre a insuficiência das vias respiratórias, produção excessiva de saliva, paralisia muscular e até mesmo tremores contínuos devido à fadiga levando à morte do organismo provocada pela sobre-estimulação dos músculos, em minutos ou poucas horas (Zurawell, et al., 2005; Fernandes, 2008). As toxinas mais prevalentes e cientificamente estudadas deste grupo são a anatoxina-a, anatoxina-a (S) e a saxitoxina. As duas primeiras toxinas atuam ao nível da acetilcolina nos músculos, mas, são diferentes no modo em que atuam. A anatoxina-a imita a acetilcolina e provoca o excesso de estimulação dos músculos levando à sua degradação. A anatoxina-a (S) inibe a acetilcolina, mas não degrada os músculos, estimulam os músculos até à morte do organismo cujos sintomas principais são o excesso de suor, tremores e salivagem excessiva. Relativamente às saxitoxinas, não são tanto uma preocupação para a saúde humana, uma vez que só são estáveis a valores de pH baixos, mas podem afetar a saúde animal. Mais recentemente foi descoberto outro grupo relevante no grupo das neurotoxinas, denominado por β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) que se pondera ser um precursor no desenvolvimento da esclerose amiotrófica lateral (ELA), caracterizada pela paralisia progressiva associada às doenças de Parkinson e Alzheimer (O'Neil, et al., 2011; Carvalho, et al., 2013; Merel, et al., 2013; Vasconcelos, 2018).

2.2.2.2. Hepatotoxinas

As hepatotoxinas recebem mais atenção por serem um dos principais motivos no desenvolvimento das toxicidades que ocorrem com mais frequência. São considerados estruturalmente de péptidos cíclicos, como é o caso das toxinas mais revelantes deste grupo, as microcistinas e nodularinas. O órgão alvo destas toxinas, como o nome indica, são as células hepáticas. São consideradas, maioritariamente, compostos hidrofílicos sendo transportados para o fígado a partir de transportadores iónicos presentes nos canais biliares e no intestino delgado. Ao atrofiarem o bom funcionamento dos hepatócitos, os

sintomas observáveis são as lesões internas graves, originadas a partir da decomposição dos filamentos e microfíamentos intermédios que asseguram a forma dos hepatócitos, provocando o aumento do peso deste órgão e hemorragias hepáticas. Após esta disfunção hepática ocorre a morte do organismo algumas horas ou em poucos dias (Fernandes, 2008; Miranda, 2014; Brandão, 2008; Carvalho, et al., 2013).

2.2.2.3. *Dermatoxinas*

Os organismos produtores destas toxinas habitam maioritariamente em ambientes marinhos. Estas toxinas provocam severas dermatites nas pessoas que frequentam estes meios e têm contacto com os seus filamentos. Para além de afetarem a pele, a atividade inflamatória de algumas espécies produtoras de dermatoxinas são promotoras de tumores graves e provocam inflamações no trato gastrointestinal caso haja a ingestão da água contaminada (Sivonen & Jones, 1999).

2.2.2.4. *Citotoxinas*

Uma das cianotoxinas também muito conhecida produzida pelas Cianobactérias é a cilindrospermopsina. Esta toxina tem ação em toda a síntese proteica, onde vai bloqueá-la, provocando sintomas primários como a falha da atividade do fígado e dos rins. Também provoca danos no baço, intestino, coração e timo. Para além destes sintomas agravados que esta toxina provoca um outro fator que a torna extremamente perigosa é o facto destes sintomas clínicos só se manifestarem dias após a exposição e contacto por parte do organismo (Mankiewicz, et al., 2003).

Geralmente, estas cianotoxinas correspondem a endotoxinas uma vez que são libertadas para o meio envolvente apenas quando há o rompimento da célula (Oliveira, et al., 2013; Carvalho, et al., 2013). Por exemplo, em situações em que as condições físicas e químicas de um meio da sua coexistência já não suportem mais o crescimento destes microrganismos, levando ao colapso de toda a biomassa das Cianobactérias (Vasconcelos, 1995). Outro motivo que proporciona a sua libertação é no processo de tratamento das águas, em que os produtos químicos utilizados para erradicar as florescências permitem a libertação das toxinas a partir da lise das células (Regueiras, 2009).

Cianotoxina	Principal órgão alvo	Efeitos toxicológicos primários	Estrutura química	Gênero de Cianobactéria que sintetiza a respetiva cianotoxina
Microcistinas	Fígado – possível carcinogénico nos tecidos deste órgão e outros tecidos	Inibem o funcionamento das fosfatases I e IIA, causando a morte das células do fígado ou promovendo o carcinoma hepático.	Péptidos Cíclicos	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis, Aphanizomenon</i>
Nodularinas	Fígado – possível carcinogénico	Hepatoentrite, insuficiência hepática, taquicardia, hepatocarcinogenese, convulsões, gastroenterites, morte		<i>Nodularia, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Anatoxina-a	Nervo sináptico	Atuam ao nível dos canais de sódio dos axónios e da fenda sináptica, por inibição da acetilcolina ocorrendo sobre estimulação muscular até à fadiga e subsequente paralisação dos músculos esqueléticos e respiratórios. Sintomas: Em vertebrados: salivação excessiva, fraqueza muscular, lacrimação, paralisia (motora, cardíaca e respiratória), morte.	Alcalóides	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon, Cylindrospermopsis</i>
Anatoxina-a (S)				<i>Anabaena</i>
Cilindrospermesina	Fígado e rins. Possível genotóxico e carcinogénico	Falha da atividade do fígado e dos rins. Danos no baço, intestino, coração e timo. Falha da atividade do fígado e dos rins. Também provoca danos no baço, intestino, coração e timo		<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia, Raphidiopsis, Anabaena</i>
β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)	Cérebro	Doença neurodegenerativa associada à Esclerose Lateral Amiotrófica/Demência	--	Várias espécies

Tabela 1 - Alguns exemplos das cianotoxinas e as suas características mais importantes que têm vindo a ser estudadas com mais frequência. Retirado e adaptado de: (Newcombe, et al., 2010; Fernandes, 2009)

2.2.3. Características genéticas das Cianobactérias

Há relativamente muito pouco tempo, mais concretamente há 23 anos, foi publicado pela primeira vez o genoma completo de uma cianobactéria, a *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko, et al., 1995). Atualmente estão disponíveis 400 genomas de

Cianobactérias e a variedade de *taxa* é pouca, uma vez que destes 400 genomas, 166 são apenas de uma espécie. Segundo uma pesquisa realizada por Alvarenga e a sua equipa, a partir da recolha de informações de genomas completos já publicados, conseguiram compreender que o material genético que caracteriza a cianobactéria é composta por um ou dois cromossomas com um tamanho entre 1,4 a 8,2 Mb e até 12 plasmídeos (Alvarenga, et al., 2017).

Apesar da pouca informação existente sobre a genética das Cianobactérias, têm sido realizados esforços por várias instituições de investigação para desenvolver estudos principalmente ao nível de genes específicos que auxiliam na classificação e identificação de espécies de Cianobactérias, como é o caso do gene 16S rRNA Ciano (Churro & Valério, 2015). Para além deste gene, também tem sido importante o estudo de outros genes que são utilizados como bioindicadores de Cianobactérias produtoras de toxinas. O grupo genético responsável pela biossíntese das microcistinas foi identificado em diferentes cianobactérias, sugerindo que uma elevada similaridade das suas sequências genéticas possuem o mesmo antepassado (Rastogi, et al., 2015).

O domínio aminotransferase (AMT), localizado nos módulos *mcyE* e *ndaF* da microcistina e complexos enzimáticos da nodularina sintetase, respetivamente, foi escolhido como a sequência alvo por causa de sua essencial função na síntese de todas as microcistinas, bem como nodularinas (Jungblut & Neilan, 2006).

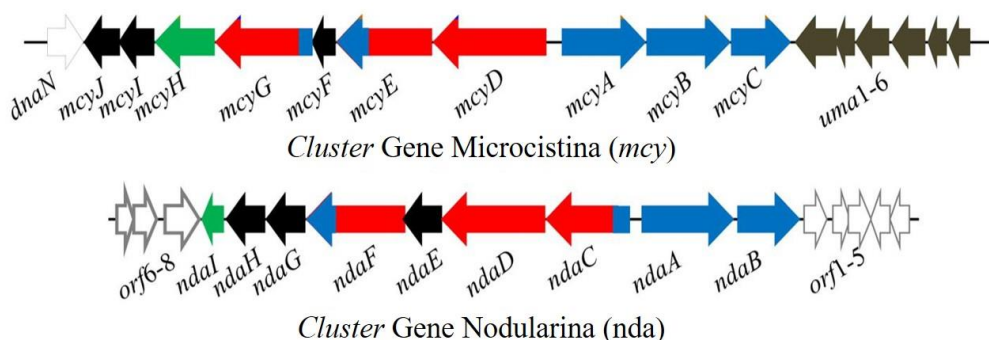


Figura 6 - Cluster correspondentes aos genes *mcy* e *nda* produzida pela *Microcystis aeruginosa* PCC7806 e pela *Nodularina spumigena* NSOR10, respetivamente [Adaptado de: (Rastogi, et al., 2015)].

2.2.4. Componente Físico-Química da Água

pH, Temperatura e Oxigénio Dissolvido (OD)

O pH, temperatura e oxigénio dissolvido são parâmetros imediatos, medidos por sonda *in situ*. Como as Cianobactérias são organismos fotossintéticos, ao consumirem dióxido de carbono durante o dia, o produto resultante é o oxigénio. Sendo assim, a existência das Cianobactérias pode ser averiguada ao verificar as variações nestes três parâmetros de análise.

O pH indica se a água apresenta propriedade ácida, neutra ou alcalina. A partir dos valores analisados é possível entender a sua influência nas espécies que habitam num determinado ecossistema aquático, bem como o seu efeito na contribuição da precipitação de elementos químicos tóxicos e em todas as fases de tratamento.

O oxigénio dissolvido é essencial para o metabolismo de organismos aeróbicos presentes em ecossistemas aquáticos naturais. A sua variação depende da produção de oxigénio realizada por organismos fotossintéticos e com o aumento da temperatura.

Condutividade

A condutividade indica a capacidade que uma amostra de água tem de transportar uma corrente elétrica a partir da medição da concentração total de partículas carregadas ionicamente dissolvidas na amostra.

Turbidez

A turbidez também é um parâmetro imediato, que indica a tendência que a água possui de propagar a luz solar, ou seja, é uma expressão da propriedade ótica que faz com que a luz seja dispersa e absorvida indicando que quanto maior for o valor que é medido da turbidez maior é a tendência que a água tem de propagar a luz. A transparência de uma massa de água é um indicador importante sobre a sua condição e produtividade. O método Nefelométrico é o utilizado para a determinação da turbidez das amostras. Baseia-se na comparação da intensidade da luz difundida pela amostra sob condições definidas por padrões de referência nas mesmas condições.

Fósforo Total e Fosfatos

Como referido anteriormente, o fósforo é um dos compostos que as Cianobactérias conseguem utilizar para garantirem o seu desenvolvimento e

sobrevivência. Ou seja, a descarga destes compostos provenientes de atividades, como a agricultura e indústria, estimulam o crescimento destes organismos uma vez que desencadeiam processos acelerados de eutrofização. Este parâmetro físico-químico permite, ao determinar a sua concentração em laboratório, os potenciais riscos associados a possíveis Cianobactérias produtoras de toxinas. Na água o fósforo está sobre a forma de fosfato, sendo assim, neste trabalho foi medida a concentração destas duas variáveis, o fósforo total e o fosfato.

Compostos Azotados – Azoto Total, Nitritos, Nitratos

Nos sistemas aquáticos o azoto apresenta várias formas azotadas, a combinação destes compostos forma o azoto total. Neste trabalho foram só realizados ensaios dos nitritos, nitratos e azoto total.

2.2.5. Componente Biológica – Clorofila *a*

No interior da sua estrutura, as Cianobactérias possuem pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a* e ficobiliproteínas. As Cianobactérias utilizam para a realização da fotossíntese, a energia proveniente da radiação solar que é convertida em energia química na forma de eletrões e energia ATP que pode ser utilizada para sintetizar compostos orgânicos a partir do dióxido de carbono (Berg & Sutula, 2015).

A fotossíntese realizada por estes organismos não ocorre a partir de organelos específicos, mas sim, diretamente no citoplasma, mais concretamente nos tilacoides que andam livremente pelo mesmo. O início deste processo começa pela captação da radiação solar realizada pelo pigmento protagonista clorofila *a* e, posteriormente, há a libertação dos eletrões dadores, fornecidos pela água, originando ATP (Berg & Sutula, 2015; Valério, 2008). As ficobiliproteínas são um grupo de pigmentos acessórios solúveis em água e também atuam nas Cianobactérias como uma antena de captação da irradiação a um comprimento de onda entre 450 e 660 nm (Pandey, et al., 2013; Sobiechowska-Sasim, et al., 2014). Este grupo que está organizado num complexo molecular denominado por ficobilossomas, é composto pela ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, que captam a irradiação a 620nm, 650nm e 565nm, respetivamente (Sobiechowska-Sasim, et al., 2014). Devido a elevadas concentrações deste pigmento as Cianobactérias ficaram conhecidas por algas verde-azuladas, bem como o termo ciano (Macário, et al., 2016).

2.2.6. Aplicações Biotecnológicas das Cianobactérias

Apesar dos impactos negativos no ambiente e saúde humana e animal devido à presença de toxinas produzidas pelas Cianobactérias, estes organismos também permitem efeitos positivos em várias áreas de investigação. Nos últimos anos as Cianobactérias têm tido uma especial atenção no campo da biotecnologia. Existem inúmeras aplicações que foram descobertas com a utilização destes organismos, uma que vez alguns dos produtos secundários que conseguem sintetizar e armazenar são utilizados nos setores da alimentação, farmacêutica, cosmética, agricultura, energia, entre outros (Rastogi, et al., 2015; Moreno, et al., 2012; Oliveira, et al., 2013; Sciuto & Moro, 2015). Um exemplo de aplicações utilizadas por mais de 40 espécies de Cianobactérias que produzem cianotoxinas com funções de compostos bioativos em campos científicos de investigação que tem tido muitos obstáculos ao longo dos últimos anos. É o caso da atividade antiviral, inclusive no HIV, anticancerígena, antibacteriana e antimalária (Oliveira, et al., 2013; Sciuto & Moro, 2015).

As Cianobactérias também são consideradas uma ótima fonte de proteínas, minerais e vitaminas, especialmente a vitamina B12, ao nível da alimentação, que permite uma otimização do sistema imunitário e da regulação da resposta alérgica, aumento da absorção de vitaminas pelo intestino, aumento dos níveis de energia do organismos, auxiliam na redução da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade causados por metais pesados e alguma medicação, permitem o desenvolvimento de medicamentos que combatem a obesidade, entre outras variedades de aplicações (Gomes, 2013; Sciuto & Moro, 2015; Oliveira, et al., 2013).

Mais recentemente, tem-se sugerido aplicar alguma das vantagens das Cianobactérias, como o seu rápido crescimento e nos mais variados meios ambientais, a habilidade de fixar vários compostos, a sua flexibilidade genética e a realização de fotossíntese, como uma alternativa de criar na produção de biocombustíveis. Apesar de ser um estudo recente e ainda em desenvolvimento, já foi possível produzir com sucesso etanol através da cianobactéria *Synechococcus elongatus* sp. Estirpe PCC 7942 (*S. elongatus*). Este etanol produzido foi considerado compatível com os combustíveis atualmente utilizados, mas ainda não os conseguem substituir uma vez que o etanol absorve a humidade do ar e tem baixa densidade de energia. Ainda assim, continua a haver um desenvolvimento nesta pesquisa ao modificar determinados aspetos

morfológicos e genéticos de várias espécies de Cianobactérias, apesar de por vezes não serem previsíveis, até se ter alcançado este revolucionário potencial para toda a vida no planeta (Nozzi, et al., 2013).

2.2.7. As Cianotoxinas no Mundo e em Portugal

“*A tragédia da Hemodiálise*” foi o caso mais conhecido na cidade do Caruaru e municípios vizinhos, no Brasil em 1996. Hepatite tóxica foi a causa de morte de 60 pacientes, que frequentavam uma clínica particular, após ter sentido uma indisposição posterior à sessão de hemodiálise. Vários jornais locais que relataram esta tragédia que aconteceu há mais de 20 anos referiram que os pacientes afetados tinham como sintomas dores de cabeça, vômitos e perda de visão. Também houve casos de outros pacientes que após algumas sessões ficaram em coma e não resistiram passado alguns dias. Este caso chamou à atenção de autoridades de saúde de vários países, onde concluíram que a morte destes pacientes foi devido à presença da hepatotoxina Microcistina-LR (Dantas, 2016; Fernandes, 2009).

Curiosamente, especula-se que o primeiro caso epidemiológico registado em Portugal, devido à exposição de cianotoxinas em águas doces, tenha sido no Hospital Espírito Santo de Évora, na unidade de hemodiálise, em 1993. Este episódio provocou a morte a 20 pacientes que recorriam à diálise. A água que era fornecida a esta unidade continha concentrações elevadas de alumínio devido ao processo de purificação da água que é necessário para este tratamento. Infelizmente não se realizaram análises que se verificasse a presença de cianotoxinas, o que não permitiu correlacionar as cianotoxinas como a principal causa de morte destes pacientes (Menezes, et al., 2017).

Em 1979, também foi registado numa comunidade da Austrália, 140 crianças e 10 adultos com sintomas de hepatoenterite, como anorexia, vômitos, dores de cabeça, hepatomegalia, diarreia e desidratação. A partir de análises clínicas ao fígado e rins, verificou-se que os pacientes tinham danos ao nível destes dois órgãos. Concluiu-se que foi uma contaminação que surgiu numa represa que já tinha sido alertada por ter mau cheiro e gosto desagradável (Siqueira & Oliveira-Filho, 2008).

Estes são um dos poucos, entre centenas, de exemplos de casos que ocorreram por todo o mundo. Sendo assim, é possível perceber a dimensão, dinâmica e flexibilidade

morfológica e genética que estes organismos produtores de toxinas possuem ao se verificar que os podemos encontrar nos mais diversos meios e, provavelmente, em qualquer país.

Capítulo 3 – Material e Métodos

3.1. Amostragem

A amostragem é um processo prático onde há a recolha de um pequeno volume de água do local a ser estudado. Os locais selecionados para apresentar neste trabalho foram a Plataforma Lucefécit, a Plataforma de Mourão e a Plataforma de Montante que estão presentes fixamente no maior reservatório artificial natural da Europa, a albufeira do Alqueva. O desenvolvimento desta albufeira teve como principais objetivos gerar uma reserva de água na bacia do Guadiana para utilizações como a agricultura, o consumo humano, animal e industrial, produção de energia elétrica e a regularização dos caudais do rio Guadiana (Morais, et al., 2017).

Este trabalho foca-se principalmente na campanha realizada no mês de setembro de 2017, quando se verificou a olho nu, um *bloom* de Microalgas, suspeitando-se que fossem Cianobactérias. Na tabela 2 estão descritos os locais e as profundidades a que foram recolhidas as amostras de água para análise química, biológica e molecular.

Tabela 2 - Representação do local da amostragem, da descrição das campanhas realizadas e os perfis analisadas em laboratório

Local	Perfis
Plataforma Lucefécit, Plataforma de Mourão e Plataforma de Montante	Superfície*, 1m, 2m, 3m, Fim Z. E., Meio* e Fundo* da Albufeira

*- As três profundidades assinaladas foram realizadas para avaliação dos parâmetros físico-químicos

Inicialmente, antes de realizar uma amostragem, é necessário verificar alguns aspetos importantes como:

- ✓ A certificação de que todos os equipamentos estão calibrados e a funcionar devidamente;
- ✓ Correta identificação dos frascos de amostragem;
- ✓ As condições ambientais correntes;
- ✓ Determinação da zona eufótica pelo disco de Secchi.

Após a verificação destes requisitos, procede-se à leitura *in situ* dos parâmetros pH, temperatura (°C), oxigénio dissolvido (% de saturação) e a condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Para a análise dos parâmetros físico-químicos, as amostras de água foram conseguidas com recurso a uma garrafa de Van Dorn com uma capacidade de 3L nas profundidades especificadas na Tabela 2.

3.2. Componente Físico-Química da Água

As análises às variáveis físico-químicas foram realizadas pelo Setor de Físico-Química do Laboratório da Água da Universidade de Évora, onde as metodologias foram seguidas com base no livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* e os resultados obtidos foram analisados segundo o Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto. Na tabela 3 estão representados os Valores Máximos Recomendados (VMR) e os Valores Máximos Admissíveis (VMA) para este tipo de matriz.

Tabela 3 - Valores Máximos Recomendados e Admissíveis, segundo o Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto na qual se rege o Sector de Físico-Química do Laboratório da Água da Universidade de Évora

Parâmetro	VMR – VMA	Unidades de Expressão dos Resultados
pH	(6,5 – 8,5) – x	Escala de Sorensen
Temperatura	22 - 25	°C
Condutividade	1000 – x	$\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20°C
Oxigénio Dissolvido	70 – x	% de Saturação
Turbidez	--	NTU
Nitratos	25 – (O) 50 (*)	mg/L NO_3
Nitritos	--	mg/L NO_2
Azoto Total	--	mg/L N
Fosfatos	0,4 – x (**)	mg/L PO_4
Fósforo Total	--	mg/L P

x – Valor não apresentado pelo Decreto-lei nº236/98 de 1 de Agosto; (O) – Os limites podem ser excedidos em caso de condições geográficas ou meteorológicas excecionais (nº1 do Artigo 10º do Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto); -- Não são apresentados nenhuns valores de VMR e VMA; (*) – Valores em N: 5,64 – 11,29 mg/L; (**) Valores em P: 0,12 mg/L

3.2.1. pH, Temperatura e Oxigénio Dissolvido (OD) *in situ*

O pH, temperatura e Oxigénio Dissolvido (OD) foram medidos *in situ* recorrendo a uma sonda multiparamétrica (AQUA TROLL 600, *In Situ*, EUA).

3.2.2. Turbidez

A metodologia da leitura da turbidez foi seguida pela ISO 7027:1999. Foi realizada com o auxílio de um frasco de vidro transparente próprio para águas superficiais e posterior leitura no *Turbidímetro Merck/WTW – Turbiquant 1500 T*, com prévia calibração e verificação do equipamento a partir da leitura de padrões de referência (0,30 NTU; 4,0 NTU; 40,0 NTU).

3.2.3. Fósforo Total e Fosfatos

3.2.3.1. Fósforo Total

Método utilizado: Digestão Ácida da amostra; Método do Ácido Ascórbico - SMEWW 4500-P E.

Soluções Preparadas:

- a) Reagente *Stock* Fósforo Particulado:
 - Medir 12 g de heptamolibdato de amónio em 500 mL de água ultrapura;
 - Adicionar 140 mL de ácido sulfúrico concentrado, cuidadosamente e em constante agitação;
 - Deixar arrefecer e adicionar 0.275 g de tartarato de potássio e antiamónio;
 - Após dissolver, perfazer o volume de 1000 mL com água ultrapura.
- b) Hidróxido de Sódio (6 N):
 - Dissolver 498 mL de hidróxido de sódio em lentilhas em 1000 mL de água ultrapura.
- c) Solução de Trabalho:
 - Medir 0,53 g de ácido ascórbico e adicionar 50 mL do Reagente *Stock* Fósforo Particulado.
- d) Solução Padrão Mãe:
 - Dissolver 0.2195 g de hidrogenofosfato de potássio em água ultrapura e diluir a 1000 mL.

e) Soluções Padrão:

- Padrão 10 mg/L = Diluir 1 mL da Solução Padrão Mãe em 100 mL de água ultrapura;
- Padrão 1 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 10 mg/L em 100 mL de água ultrapura;
- Branco / Padrão 0 mg/L = 10 mL de água ultrapura;
- Padrão 0.04 = 40 µL do Padrão 1 mg/L em 10 mL de água ultrapura;
- Padrão 0.30 = 300 µL do Padrão 1 mg/L em 10 mL de água ultrapura.

Procedimento:

1. Em erlenmeyers de 250 mL colocar 100 mL de amostra. Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico e 5 mL de ácido nítrico em cada amostra e colocar na placa de aquecimento para a realização da digestão da amostra;
2. Quando a amostra evaporar parcialmente, retirar da placa de aquecimento e deixar arrefecer;
3. Adicionar 20 mL de água ultrapura em cada amostra e uma gota de fenolftaleína;
4. Adicional hidróxido de sódio com uma concentração de 6N, com agitação simultânea, até a amostra apresentar uma coloração rosa;
5. Transferir a amostra para balões de 100 mL e perfazer o volume com água ultrapura;
6. Agitar bem e retirar 10 mL das amostras, padrões (0,04 mg/L; 0,30 mg/L; 1 mg/L) e branco (0 mg/L) para tubos de ensaio. Preparar a solução de ácido ascórbico, adicionar 1mL em cada tubo de ensaio e agitar no vortex. Esperar 15 minutos até as amostras apresentarem uma coloração azulada.
7. As leituras da concentração são realizadas por espectrofotometria de absorção no UV-visível a partir do espectrofotômetro *Thermo Scientific – Evolution 300* com um comprimento de onda de 882nm.

3.2.3.2. Fosfatos

Método utilizado: Método do Ácido Ascórbico - SMEWW 4500-P E

Soluções Preparadas:

- a) Reagente Stock Fósforo Particulado:

- Medir 12 g de heptamolibdato de amónio em 500 mL de água ultrapura;
 - Adicionar 140 mL de ácido sulfúrico concentrado, cuidadosamente e em constante agitação;
 - Deixar arrefecer e adicionar 0.275 g de tartarato de potássio e antiamónio;
 - Após dissolver, perfazer o volume de 1000 mL com água ultrapura.
- b) Solução de Trabalho:
- Medir 0,53 g de ácido ascórbico e adicionar 50 mL do Reagente Stock Fósforo Particulado
- c) Solução Padrão Mãe:
- Adicionar 1 mL da Solução Padrão de Fosfato comercial em 100 mL de água ultrapura.
- d) Soluções Padrão:
- Padrão 10 mg/L = Diluir 1 mL da Solução Padrão Mãe em 100 mL de água ultrapura;
 - Padrão 1 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 10 mg/L em 100 mL de água ultrapura;
 - Branco / Padrão 0 mg/L = 10 mL de água ultrapura
 - Padrão 0,12 mg/L = Diluir 6 mL do Padrão 1 mg/L em 50 mL de água ultrapura;
 - Padrão 3 mg/L = Diluir 15 mL do Padrão 10 mg/L em 50 mL de água ultrapura;

Procedimento:

1. Adicionar 10 mL das amostras filtradas, padrões (0,12 mg/L; 1 mg/L; 3 mg/L) e branco (0 mg/L) para tubos de ensaio.
2. Preparar a solução de ácido ascórbico, adicionar 1mL em cada tubo de ensaio e agitar no vórtex;
3. Esperar 15 minutos até as amostras apresentarem uma coloração azulada.
4. As leituras da concentração são realizadas por espectrofotometria de absorção no UV-visível a partir do espectrofotómetro *Thermo Scientific – Evolution 300* a um comprimento de onda de 882nm.

3.2.4. Azoto Total, Nitritos, Nitratos

3.2.4.1. Azoto Total

Método: Método do Persulfato pela Redução em Coluna de Cádmio - SMEWW 4500-N.C e SMEWW 4500-NO3.E

Soluções Preparadas:

- a) Solução Reagente de Digestão:
 - Dissolver 20,1 g de persulfato de potássio em água ultrapura em constante agitação;
 - Dissolver 3,0 g de hidróxido de sódio e perfazer o volume de 1000 mL com água ultrapura.

- b) Solução Tampão Borato:
 - Dissolver 61,8 g de ácido bórico e 8,0 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água ultrapura.
- c) Solução Reagente de Cor:
 - Adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85% e 10g de sulfanamida em 800 mL de água ultrapura, com agitação constante;
- d) Solução Cloreto de Amónio-EDTA:
 - Dissolver 13 g de cloreto de amónio em 900 mL de água ultrapura, em constante agitação;
 - Adicionar 1.7 g de etileno diamina tetracetato disódico;
 - Ajustar o pH para 8,5 e perfazer 1000 mL com água ultrapura.
- e) Solução de Lavagem:
 - Diluir 300 mL da Solução Cloreto de Amónio-EDTA para 500 mL de água ultrapura.
- f) Soluções Padrão
 - Padrão 100 mg/L = Diluir 10 mL da Solução Padrão Comercial de 1000 mg/L de NO₃ em 100mL de água ultrapura;
 - Padrão 10 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 100 mg/L em 100mL de água ultrapura;
 - Branco / Padrão 0 mg/L = 20 mL de água ultrapura;
 - Padrão 0,5 mg/L = Diluir 1 mL do Padrão 10 mg/L em 20 mL de água ultrapura;

- Padrão 2,5 mg/L = Diluir 5 mL do Padrão 10 mg/L em 20 mL de água ultrapura;
- Padrão 5 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 10 mg/L em 20 mL de água ultrapura;

Procedimento:

1. Retirar 25 mL da amostra, padrões (0,5 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L) e branco para um erlenmeyer de 100 mL e adicionar 10 mL da Solução Reagente de Digestão;
2. Agitar e colocar na autoclave durante 30 minutos a uma temperatura de 100°C a 110°C;
3. Deixar a amostra digerida arrefecer e adicionar 2 mL da Solução Tampão Borato;
4. Em copos adicionar: 25 mL de amostra, padrão ou branco, e 75 mL da Solução Cloreto de Amônio-EDTA;
5. Lavar a coluna de cádmio com água ultrapura. Posteriormente, passar pela coluna a Solução de Lavagem para a sua ativação e descartar;
6. Passar pela coluna o branco, padrões e amostra;
7. Após a passagem de cada amostra pela coluna, transferir para um balão de 50 mL e descartar o resto;
8. Adicionar 2 mL Solução Reagente de Cor e esperar no mínimo 15 minutos;
9. As leituras da concentração são realizadas por espectrofotometria de absorção no UV-visível a partir do espectrofotômetro *Thermo Scientific – Evolution 300* com um comprimento de onda de 543nm.

3.2.4.2. Nitritos

Método: SMEWW 4500-NO2 B

Soluções Preparadas:

- a) Solução Reagente de Cor:
 - Em 800 mL de água ultrapura, cuidadosamente e em constante agitação, diluir 100 mL de ácido fosfórico concentrado 85%;
 - Adicionar 10 g de sulfanilamida até dissolver;
 - Adicionar 1g de cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina e perfazer o volume de 1000 mL com água ultrapura.
- b) Soluções Padrão:

- Padrão 10 mg/L = Diluir 10 mL da Solução Comercial de 1000 mg/L em 1000 mL de água ultrapura;
- Padrão 0,25 mg/L = Diluir 5 mL do Padrão 10 mg/L em 200 mL de água ultrapura;
- Padrão 0,1 mg/L = Diluir 20 mL do Padrão 0,25 mg/L em 50 mL de água ultrapura;
- Padrão 0,025 mg/L = Diluir 5 mL do Padrão 0,25 mg/L em 50 mL de água ultrapura.

Procedimento:

1. Adicionar 50mL de amostra filtrada em balões de 50mL, bem como os padrões e o branco;
2. Adicionar 2mL do Reagente de Cor e aguardar no mínimo 15 minutos;
3. As leituras da respetiva concentração são realizadas por espectrofotometria de absorção no UV-visível a partir do espectrofotómetro *Thermo Scientific – Evolution 300* com um comprimento de onda de 543nm.

3.2.4.3. Nitratos

Método: Redução em Coluna de Cádmio - SMEWW 4500-NO3 E

Soluções Preparadas:

- a) Solução Reagente de Cor:
 - Adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85% e 10g de sulfanamida em 800 mL de água ultrapura, com agitação constante;
- b) Solução Cloreto de Amónio-EDTA:
 - Dissolver 13 g de cloreto de amónio em 900 mL de água ultrapura, em constante agitação;
 - Adicionar 1.7 g de etileno diamina tetracetato disódico;
 - Ajustar o pH para 8,5 e perfazer 1000 mL com água ultrapura.
- c) Solução de Lavagem:
 - Diluir 300 mL da Solução Cloreto de Amónio-EDTA para 500 mL de água ultrapura.
- d) Soluções Padrão:

- Padrão 100 mg/L = Diluir 10 mL da Solução Padrão Comercial de 1000 mg/L de NO₃ em 100mL de água ultrapura;
- Padrão 10 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 100 mg/L em 100 mL de água ultrapura;
- Padrão 1 mg/L = Diluir 10 mL do Padrão 10 mg/L em 100 mL de água ultrapura;
- Branco / Padrão 0 mg/L = 20 mL de água ultrapura;
- Padrão 0,05 mg/L = Diluir 5 mL do Padrão 1 mg/L em 100 mL de água ultrapura;
- Padrão 0,2 mg/L = Diluir 20 mL do Padrão 1 mg/L em 100 mL de água ultrapura;

Procedimento:

1. Em copos adicionar: 25 mL de amostra filtrada, padrões (0,05 mg/L; 0,20 mg/L; 1 mg/L) ou branco, e 75 mL da Solução Cloreto de Amónio-EDTA;
2. Lavar a coluna de cádmio com água ultrapura. Posteriormente, passar pela coluna a Solução de Lavagem para a sua ativação e descartar;
3. Passar pela coluna de cádmio o branco, padrões e amostra;
4. Após a passagem de cada amostra pela coluna de cádmio, transferir para um balão de 50 mL e descartar o resto;
5. Adicionar 2 mL Solução Reagente de Cor e esperar no mínimo 15 minutos;
6. As leituras da concentração são realizadas por espectrofotometria de absorção no UV-visível a partir do espectrofotómetro *Thermo Scientific – Evolution 300* com um comprimento de onda de 543nm;

3.3. Componente Biológica

As análises à componente biológica, neste caso à clorofila *a*, foram realizadas pelo Setor de Microalgas do Laboratório da Água da Universidade de Évora, segundo o Protocolo de Amostragem e Análise para o Fitoplâncton (Instituto da Água, I.P., 2009)

3.3.1. Clorofila *a*

Método: Método de Extração com Acetona – Metodologia com base nas normas NP 4327:1996, EN:ISO 10260:1992 e SMEWW 10200 H.

Soluções Preparadas:

- a) Solução Aquosa de Acetona a 90% (v/v):

- Num balão volumétrico de 100 mL, adicionar 90 mL de Acetona pró-análise e 10 mL de água destilada e homogeneizar;

Procedimento:

1. Colocar o filtro de fibra de vidro no suporte de filtração. Homogeneizar a amostra e filtrar o volume pretendido com o auxílio da rampa de filtração e da bomba de vácuo, não excedendo os 10 minutos e ter uma pressão de filtração inferior a 50mmHg para prevenir a destruição das células;
2. Cuidadosamente retirar, dobrar e enxugar os filtros;
3. Introduzir os filtros nos respetivos tubos de centrifugação de 15 mL, devidamente identificados e selados com papel de alumínio;
4. Na Hotte, adicionar 5mL da Solução Aquosa de Acetona a 90% (v/v) em cada tudo de centrifugação e macerar o filtro;
5. Adicionar novamente 5 mL da Solução Aquosa de Acetona a 90% (v/v);
6. Centrifugar durante 20 minutos a 3000/4000 rpm;
7. Pipetar cuidadosamente 3 mL da amostra centrifugada para a célula de 1 cm;
8. As leituras da concentração de clorofila *a* são realizadas, imediatamente após a centrifugação, por espectrofotometria de absorção molecular a partir do espectrofotómetro *Thermo Scientific – Evolution 300* com um comprimento de onda de 630 nm, 647 nm, 664 nm e 750 nm, contra o branco de acetona 90%. Por último calcula-se a concentração da clorofila *a* segundo a equação de Jeffrey e Humphrey (1975) (Equação 1).

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11,85(A_{664}-A_{750})-1,54(A_{647}-A_{750})-0,08(A_{630}-A_{750})\times V_1]}{(V_2 \times I)}$$

Equação 1 - Determinação da concentração da Clorofila a pelo cálculo proposto por Jeffrey e Humphrey

Onde A_{630} , A_{647} , A_{664} e A_{750} correspondem aos comprimentos de onda da clorofila *a*, *b* e *c*, respetivamente, enquanto o comprimento de onda A_{750} digna-se a corrigir a turbidez, mesmo após a filtração da amostra; V_1 e V_2 correspondem ao volume de acetona a 90% (mL) utilizado na extração e ao volume da amostra filtrada, respetivamente; I corresponde ao percurso ótico da célula do espectrofotómetro (Amand, 2012).

3.4. Determinação da Presença de Cianobactérias por Biologia Molecular

3.4.1. Extração de DNA

A extração dos ácidos nucleicos, neste caso o DNA, é o passo inicial para a reação da cadeia em polimerase (PCR). Sendo assim, recorreu-se à utilização do produto *E.Z.N.A® Water DNA Kit: D5525-01* da *VWR/Omega bio/tek*, a partir dos produtos fornecidos como o Reagente cHTR, Tampão SLX-Mlus, Tampão P2, Tampão DS, Tampão XP1, Tampão de Eluição e o Tampão de Lavagem de DNA. Na tabela 4 está presente a informação correspondente aos *primers* que foram utilizados, para extrair os genes de interesse.

Tabela 4 - Informação dos Primers que foram utilizados na amplificação de cada um dos genes alvo

Gene Alvo	Primer	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho (bp)	Referência Bibliográfica
<i>16S rRNA</i> (fragmento específico para Cianobactérias)	27F 809R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GCTTCCGGCACGGCTCGGGTCGATA	780	(Neilan, et al., 1997) (Jungblut & Neilan, 2006)
<i>mcyA</i>	<i>mcyA</i> -CD1F <i>mcyA</i> -CD1R	AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	297	(Hisbergues, et al., 2003)
<i>mcyB</i>	<i>mcyB</i> 2959F <i>mcyB</i> 3278R	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC	350	(Nonneman & Zimba, 2002)
<i>mcyE/nda</i>	HEPF HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGCCATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472	(Jungblut & Neilan, 2006)

Soluções Preparadas:

- Diluir o Tampão de Lavagem do DNA com 60 mL de Etanol 100% e guardar à temperatura ambiente;
- Adicionar 10 µL de 2-mercaptoetanol por cada 1 mL do Tampão SLX-Mlus antes da sua utilização;

Procedimento:

- Filtrar as amostras de água com filtros de papel com 0,22 µm ou 0,45 µm;
- Cuidadosamente, retirar o filtro do adaptador, cortar o filtro em várias partes e colocá-lo em tubos de centrifugação de 10mL. Adicionar 3 mL do Tampão SLX-Mlus e 500 mg de Esferas de Vidro X;
- Agitar com o auxílio do vórtex, na sua velocidade máxima, durante 5-10 minutos;

4. Adicionar 1 mL do Tampão DS e incubar a 70°C durante 10 minutos. Agitar com o vórtex duas a três vezes durante o tempo de incubação;
5. Adicionar 1 mL do tampão P2 e agitar vigorosamente no vórtex;
6. Colocar em repouso durante 5 minutos em gelo
7. Centrifugar a uma velocidade de 4000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente;
8. Transferir o sobrenadante para novos tubos de centrifugação de 10 mL;
9. Adicionar em cada tubo 0,7 volumes de isopropanol e agitar as amostras invertendo 20 vezes;
10. Centrifugar a uma velocidade de 4000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente;
11. Retirar cuidadosamente e descartar o sobrenadante, sem perturbar o *pellet* de DNA;
12. Adicionar 400 µL do Tampão de Eluição (aquecido previamente a 65°C). Agitar no vórtex durante 20 segundos;
13. Incubar a 65°C durante 10 minutos de modo a que o DNA se dissolva;
14. Transferir a amostra para tubos de centrifugação de 1,5 mL e adicionar 100 µL do reagente cHTR. Agitar no vórtex durante 10 segundos;
15. Deixar repousar à temperatura ambiente durante 2 minutos;
16. Centrifugar a 14000 g durante 3 minutos;
17. Transferir o sobrenadante para novos tubos de centrifugação de 1,5 mL e adicionar um volume igual ao que foi extraído de sobrenadante do Tampão XP1. Agitar vigorosamente no vórtex;
18. Inserir a Mini Coluna HiBind® DNA nos Tubos de Recolha de 2 mL fornecidos. Antes de se proceder a este passo é necessário equilibrar as colunas a serem utilizadas:
 - a. Adicionar 100 µL de NaOH 3M em cada Mini Coluna HiBind® DNA;
 - b. Centrifugar na velocidade máxima durante 60 segundos;
 - c. Descartar o produto filtrado e reutilizar o Tubo de Recolha;
19. Transferir a amostra na totalidade para as respetivas Mini Colunas HiBind® DNA;
20. Centrifugar a 10000 g durante 1 minuto à temperatura ambiente;
21. Descartar o filtrado e reutilizar o Tubo de Recolha;

22. Adicionar 300 μL do Tampão XP1, centrifugar 10000 g durante 1 minuto à temperatura ambiente, descartar o filtrado e reutilizar o Tubo de Recolha;
23. Transferir as Mini Colunas HiBind® DNA para novos Tubos de Recolha de 2 mL e adicionar 750 μL do Tampão de Lavagem de DNA;
24. Centrifugar a uma velocidade máxima durante 1 minuto, descartar o filtrado e reutilizar o Tubo de Recolha;
25. Centrifugar as Mini Colunas HiBind® DNA vazias durante 2 minutos à velocidade máxima para secar a matriz da coluna;
26. Transferir as Mini Colunas HiBind® DNA para os tubos de centrifugação de 1,5 mL e adicionar 50-100 μL do Tampão de Eluição no centro da membrana das colunas;
27. Incubar a 65°C durante 5 minutos, centrifugar à velocidade máxima de 5 minutos e, por fim, guardar as amostras de DNA a -20°C.

3.4.2. Determinação da Concentração de DNA

A concentração do DNA, utilizando 20 μL de cada amostra, foi estimada a partir de leituras por espectrofotometria de absorção molecular com espectrofotómetro *Thermo Scientific – Evolution 300*, na absorvância de 260 nm e os cálculos segundo a seguinte fórmula de cálculo (Equação 2).

$$[DNA] = 1 \text{ OD Abs}260 \times 50 \mu\text{L} \times \text{Fator de Diluição}$$

Equação 2 - Determinação da concentração do DNA extraído das amostras de água

Para determinarmos a concentração e grau de pureza das amostras, esta foram lidas a vários comprimentos de onda, nomeadamente 230 nm, 280 nm e 320 nm. O rácio Abs260/230 nm dá-nos a indicação que existe contaminação de compostos orgânicos e sais, que por sua vez absorvem neste comprimento de onda (por exemplo a ureia, EDTA, hidratos de carbono, fenóis, detergentes não-iónicos, entre outros). Tanto a Abs230 nm como a Abs280 nm não interferem na concentração de DNA, mas a sua informação indica-nos o estado de pureza da amostra (Koetsier & Cantor, 2019; Olson & Morrow, 2012). Com o comprimento de onda a 320 nm obtemos a leitura da turbidez presente na amostra. Sendo assim, é possível corrigir e obter o valor para a concentração de DNA das amostras a partir da fórmula de cálculo derivada da Lei de *Lambert-Beer* (Oswald, 2017)

com a subtração dos valores em Abs320 nm o que permite eliminar qualquer tipo de interferência provocada pela turbidez (Equação 3).

$$[DNA](\text{com correção}) = (Abs260 - Abs320) \times 50 \times \text{Fator de Diluição} \text{ (ng/}\mu\text{L)}$$

Equação 3 - Determinação da concentração de DNA com a correção a partir dos valores resultantes das leituras com as absorvâncias de 230 nm e 320 nm

3.4.3. Amplificação de DNA

Para amplificar a sequência dos genes *in vitro* de forma fácil, rápida e seletiva dos fragmentos de DNA específicos, utilizou-se uma das técnicas de análise mais frequente e automatizada, o PCR em tempo real, considerado muito sensível podendo detetar sequências alvo que apresentem um número baixo de cópias numa determinada amostra. Sintetizando, para o PCR em tempo real é necessário ter presente a sequência que se pretende amplificar, um par de *primers* com sequências complementares dos terminais 3' de cada cadeia, nucleótidos e a enzima *Taq* DNA polimerase que é utilizada para promover o crescimento das sequências alvo e é resistente a temperaturas elevadas principalmente as que são utilizadas em cada ciclo de PCR. Por cada ciclo de PCR o procedimento inicia-se com a desnaturação que consiste na incubação do DNA a 95°C para separar as cadeias duplas. De seguida ocorre o emparelhamento dos *primers* que flanqueiam as sequências alvo. Com a descida da temperatura para 55°C as duas cadeias complementares do DNA alvo continuam desnaturadas por estarem em concentrações baixas não se encontrando para se emparelharem. Sendo assim, os *primers*, estando em concentrações mais elevadas, vão se emparelhar com as cadeias alvo. Para completar o ciclo, a uma temperatura de 72°C, é realizada a síntese do DNA com elevada fidelidade a partir da enzima *Taq* DNA polimerase, que utiliza como molde a cadeia a que cada *primer* está emparelhado (Videira, 2011; Moreira, et al., 2014; Glick, et al., 2010).

Para este procedimento recorreu-se ao *kit* da *BIORAD – iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix*, para a amplificação dos genes 16S rRNA Ciano, *mcyA*, *mcyB* e *mcyE/nda*. Este *kit* é uma mistura duas vezes concentrada com uma reação otimizada pronta para ser utilizada em instrumentos de PCR em tempo-real e que contém todos os reagentes necessários e indispensáveis para que as reações de PCR ocorram. Cada ciclo de PCR envolveu 4 fases:

- a) Desnaturação inicial a 95°C, que implica desnaturação do DNA, de modo a separar as cadeias simples, e ativação da enzima *Taq* DNA polimerase, com libertação do anticorpo acoplado (*HotStart*) (3 minutos);
- b) Desnaturação a 95°C da cadeia dupla de DNA (10 segundos);
- c) Emparelhamento dos *primers* que flanqueiam o DNA à medida que a temperatura vai diminuindo até 55°C (30 segundos);
- d) Por fim, a síntese do DNA é realizada pela *Taq* polimerase a 72°C (30 segundos).

Os passos b, c e d foram repetidos 40 vezes pelo equipamento de PCR *CFX 96 Deep Well Optical Reaction Mod* da *Biorad*.

Soluções Preparadas:

- a) Mistura Primária

Tabela 5 - Mistura Primária preparada segundo o protocolo do kit *BIORAD – iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix*

Componente	Concentração dos reagentes dentro do tubo de reação	Volume para <u>uma</u> reação de PCR de 20 µL em cada tubo da placa
<i>iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix</i>	1X	10 µL
<i>Primer</i> (16S rRNA Ciano, <i>mcyA</i> , <i>mcyB</i> e <i>mcyE/nda</i>) <i>Forward</i>	250 nM	0,4 µL
<i>Primer</i> (16S rRNA Ciano, <i>mcyA</i> , <i>mcyB</i> e <i>mcyE/nda</i>) <i>Reverse</i>	250 nM	0,4 µL
Albumina de Soro Bovina (BSA)	0,5 µM	1 µL
Água estéril	-	7,2 µL
DNA extraído	2,5 ng/µL	Variável*

*Volume de amostra variável de modo a ter uma concentração final de 2,5 ng/µL

Para todas as amostras foi usada uma concentração de DNA total de 2,5 ng/µL. A partir do *kit* utilizado é possível monitorizar o DNA amplificado a partir de um marcador fluorescente que funciona quando se liga à dupla cadeia do DNA e é irradiado com uma luz num determinado comprimento de onda sendo possível observar a produção do produto do PCR, já que a quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA produzida (Microbial, 2009; Glick, et al., 2010).

Os resultados do PCR em tempo real são obtidos seguindo curvas exponenciais, ou gráficos de amplificação. Como é exemplificado na Figura 5, a curva de amplificação consiste numa primeira fase onde a produção de fluorescência está abaixo do nível de detecção. A segunda fase inicia-se com o aumento exponencial da fluorescência. A terceira e última fase é quando a reação acaba e a fluorescência estabiliza.

O ponto de interseção entre a curva de amplificação e a linha correspondente ao limite, denomina-se por Ct (*Cycle threshold*), que nos dá a indicação em que ciclo a fluorescência alcança o valor limite, por isso, é considerada uma medida relativa da concentração do alvo na reação de PCR. É inversamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra, ou seja, quando menor o valor de Ct, maior a quantidade de DNA.

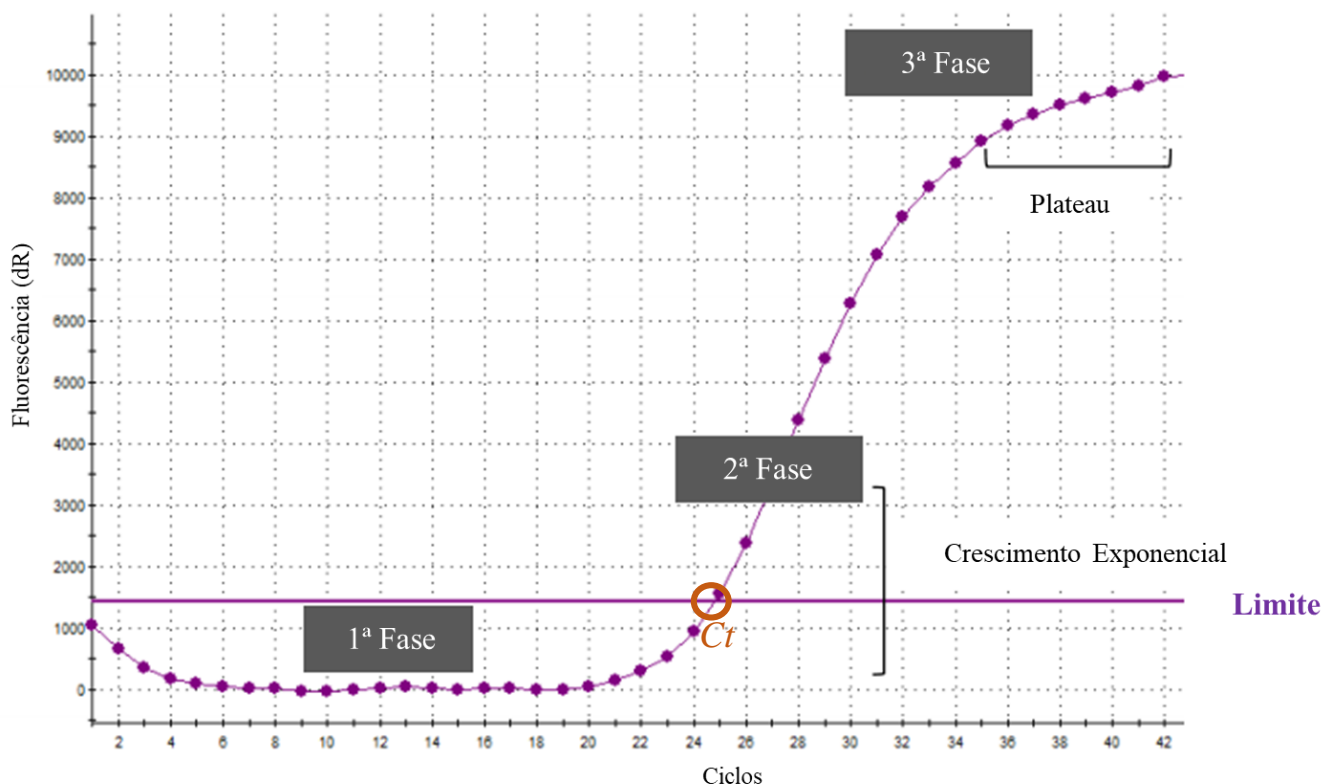


Figura 7 - Exemplo da representação gráfica da amplificação obtida após toda a corrida do PCR em tempo real (Microbial, 2009)

Para ajudar na interpretação dos resultados, os valores da “expressão relativa” de cada gene, ou seja, a presença de DNA alvo em cada amostra foi determinada com a seguinte equação:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{1}{Ct} \times 100$$

Equação 4 - Equação de expressão relativa

3.5. Análise Estatística

Os resultados foram tratados a partir do suplemento *RealStats* do *Microsoft Excel*. Apesar de termos poucos dados para cada ponto, uma vez que se trata de uma única situação de amostragem, os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para testar se seguiam uma distribuição normal. Como tal não se verificou, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para testar as diferenças significativas entre os grupos. Para analisar especificamente quais os grupos que possuem diferenças significativas entre si, selecionou-se o teste *Pairwise Mann-Whitney*. Também se realizou o teste de estatística descritiva onde se obtiveram os principais fatores para a construção da representação gráfica.

Para correlacionar variáveis diferentes utilizou-se o programa *STATISTICA*. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar os seguintes tipos de correlações entre eles, ou seja:

- a) Correlação Forte: Valores superiores a 0,7 ou valores inferiores a -0,7;
- b) Correlação Mediana: Valores entre 0,5 e 0,7 ou valores entre -0,5 ou -0,7;
- c) Correlação Fraca: Valores entre 0,3 e 0,5 ou valores entre -0,3 e -0,5;
- d) Não existe correlação: Valores no intervalo de 0,3 a -0,3.

Caso os valores obtidos forem positivos significa que as variáveis que estão a ser correlacionadas são proporcionais, se forem valores negativos, a sua correlação é inversamente proporcional.

Capítulo 4 – Apresentação e Discussão de Resultados

Apesar de se ter realizado um estudo geral, resolveu-se primeiramente dar ênfase aos resultados referentes à campanha onde se observou o *bloom* de Cianobactérias, Setembro de 2017, uma vez que é esse o foco deste trabalho.

4.1. Variáveis Físico-Químicas da Água em Setembro de 2017

4.1.1. Diferenças entre as Plataformas

Os parâmetros físico-químicos foram apenas recolhidos a 3 profundidades: superfície, meio e fundo da albufeira.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores medianos, mínimos e máximos para as diferentes plataformas, para as variáveis físico-químicas, considerando as três profundidades analisadas juntamente.

Tabela 6 - Resultados dos parâmetros Físico-Químicos [Mediana (mínimo- máximo)], nas diferentes plataformas, assim como valores de *p* resultantes do teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$). Os valores a negrito representam os valores medianos mais elevados e, na coluna das Diferença entre Plataformas, as diferenças significativas) ($n=21$)

Parâmetro (unidades)	Lucefécit	Mourão	Montante	Diferenças entre Plataformas (valor <i>p</i>)
Temperatura (°C)	22,1 (19,2 – 22,3)	22,7 (16,1 – 23,6)	22,8 (14,3 – 22,8)	0.308908
pH (Sorensen)	8,74 (7,04 – 9,09)	8,52 (7,39 – 8,98)	7,99 (7,43 – 8,27)	0.134581
Condutividade (uS/cm)	532,5 (525 – 584)	109,1 (108,7 – 562)	515,0 (501 – 528)	0.012957 *
Turbidez (NTU)	14,5 (11,3 – 31,0)	6,97 (6,53 - 15.3)	1,59 (0,83 - 6.33)	0.050906
Oxigénio Dissolvido (% sat O ₂)	107,1 (0,8 – 119)	1,7 (0,2 - 107,7)	(**)	0,063291
Nitratos (mg N/L)	0,585 (0,558 – 0,782)	0,533 (0,524 – 0,623)	0,497 (0,450 – 0,592)	0,329193
Nitritos (mg N/L)	0,002 (0,001 – 0,002)	0,002 (0,001 – 0,002)	0,002 (0,001 – 0,003)	0,90252
Azoto total (mg N/L)	2,250 (2,120 – 3,740)	1,127 (0,847 – 1,508)	0,824 (0,771 – 1,246)	0,050906
Fosfatos (mg P/L)	0,103 (0,003 – 0,173)	0,020 (0,018 – 0,207)	0,030 (0,014 – 0,057)	0,875173
Fósforo total (mg P/L)	0,078 (0,058 – 0,213)	0,043 (0,030 – 0,242)	0,087 (0,038 – 0,125)	0,837128

(**) Sem dados devido a avaria da sonda de OD

De um modo geral, ao avaliar os valores representados na Tabela 6 e seguindo a análise segundo o Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, é possível observar que os valores obtidos de todos os parâmetros são inferiores ou estão entre os VMR e VMA em todos os locais, com a exceção do pH em Lucefécit e o OD em Lucefécit e Mourão que apresentam valores um pouco superiores aos recomendáveis (ver Tabela 3). Para além disso, sendo o valor de p inferior a 0,05, só se verifica diferenças significativas entre plataformas no parâmetro da condutividade. O conjunto de gráficos referentes aos parâmetros físico-químicos permitem uma visualização da distribuição em profundidade dos resultados, para as diferentes plataformas (Figura 8 a 5).

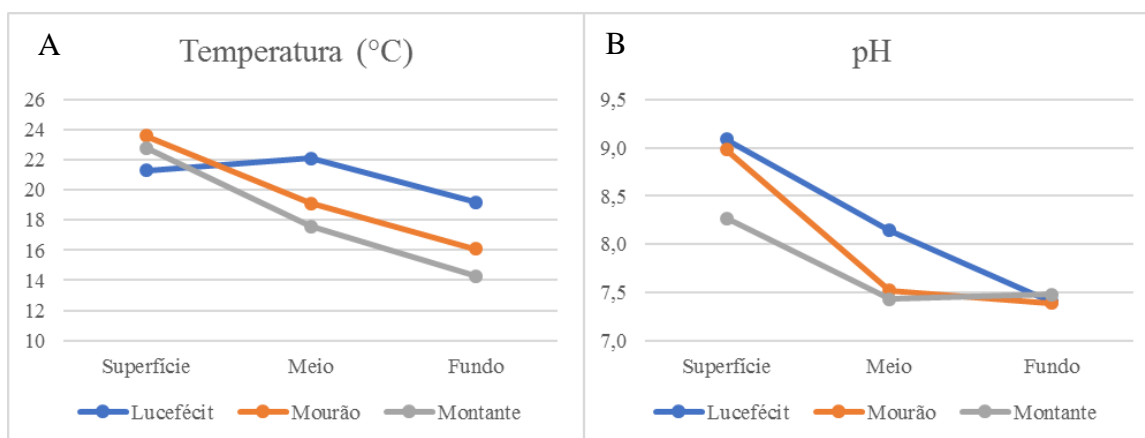


Figura 8 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos Temperatura (°C) (A) e o pH (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

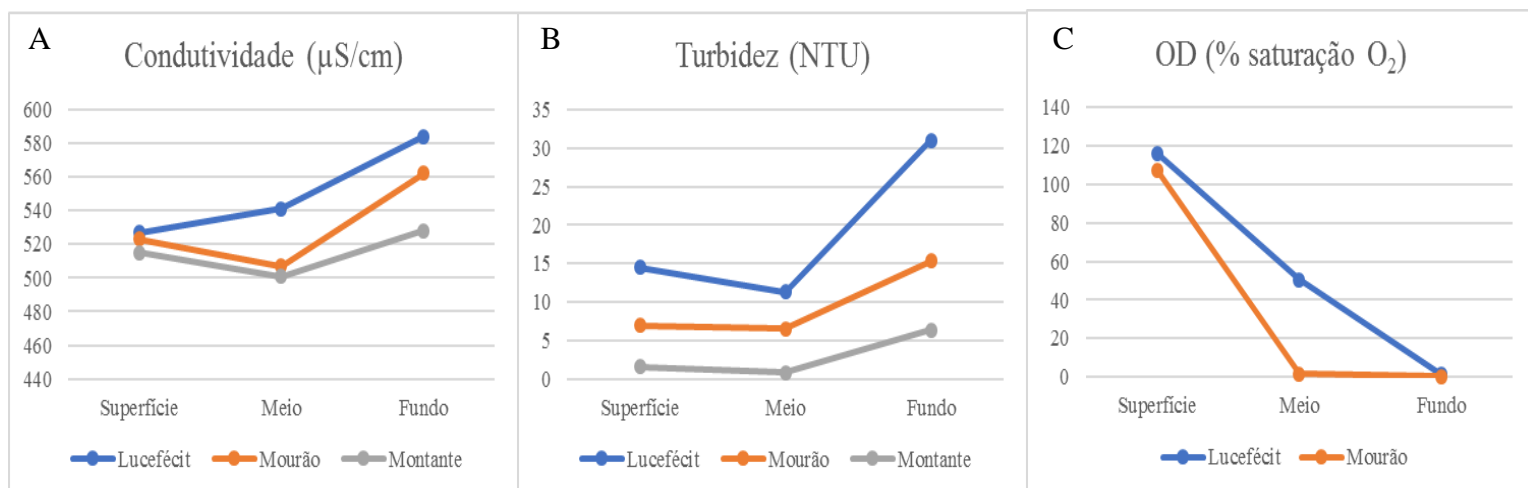


Figura 9 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos Condutividade (A), Turbidez (B) e Oxigénio Dissolvido (C). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

Com base nos resultados, podemos observar que na maioria dos parâmetros *in situ* e Turbidez são maioritariamente superiores na Plataforma de Lucefécit. Na temperatura, pH e OD, observou-se uma diminuição dos valores com a profundidade, ao contrário da Condutividade e Turbidez que aumentaram com a profundidade. Estes resultados indicam-nos que a albufeira se encontra em período de estratificação. Os valores de Turbidez aumentam no fundo pois a água encontra-se muito próxima da camada sedimentar. No entanto, a transparência à superfície da água foi medida recorrendo ao Disco de Secchi, para determinação da Zona Eufótica (Z.E.), ou seja, até onde a luz entra na coluna de água. Verificou-se uma grande diferença entre locais, com Lucefécit com 1 m de Z.E., seguido de mourão com 2,5 m e por último Montante com 6,3 m. Estas diferenças são diretamente proporcionais à profundidade de cada plataforma (Lucefécit 20 m, Mourão 45 m e Montante 65 m, aproximadamente), e poderão explicar alguns dos resultados obtidos.

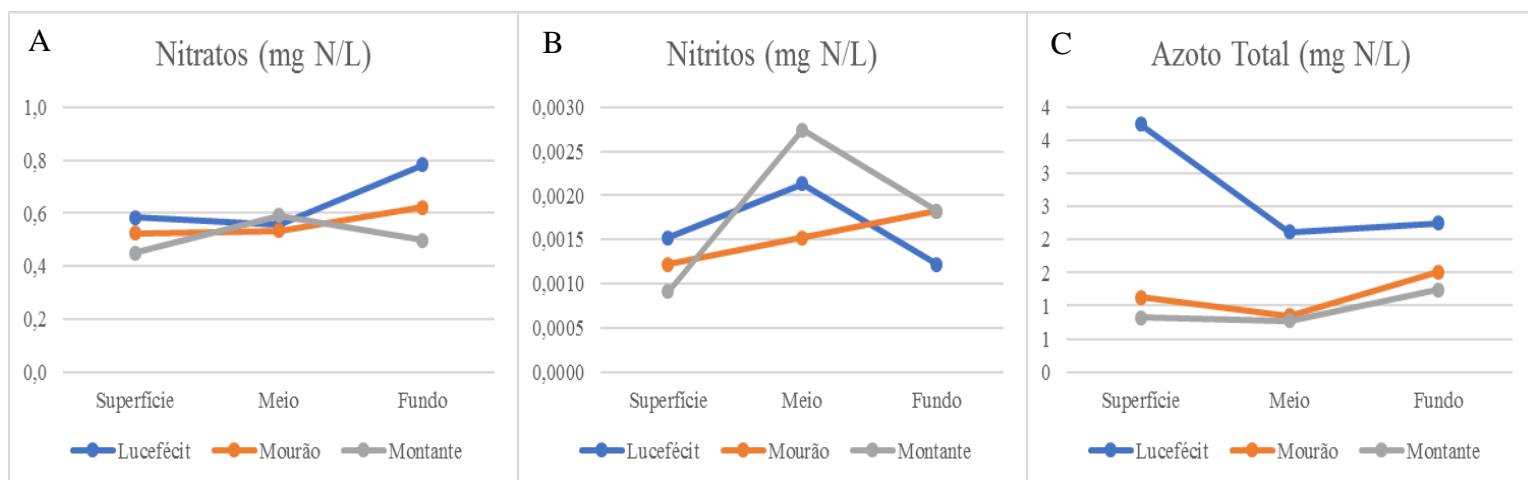


Figura 10 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos dos compostos azotados, Nitratos (A), Nitritos (B) e Azoto Total (C). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

Relativamente aos compostos de Azoto, observou-se que não se verificaram diferenças significativas em profundidade para os Nitritos e Nitratos (Figura 10, A-C). O azoto total em Lucefécit foi sempre superior, relativamente aos outros locais, sendo uma diferença quase significativa (Tabela 6, $p = 0,050906$).

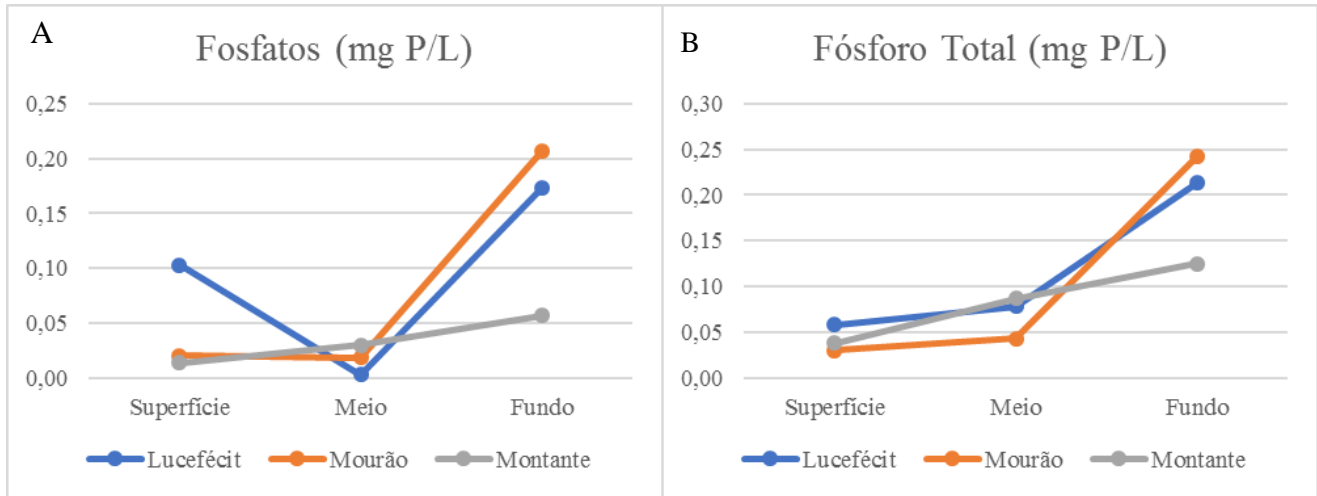


Figura 11 - Representação gráfica dos parâmetros físico-químicos Fosfatos(A) e Fósforo Total (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

Os compostos de fósforo apresentam um padrão semelhante, com valores inferiores na superfície e meio e superiores no fundo. Não se observaram diferenças significativas entre locais.

A partir da interpretação do Figura 11, verificou-se que em todos os locais é possível observar-se um aumento dos fosfatos e fósforo total no fundo da albufeira o que poderá indicar que, com o fornecimento limitado do oxigénio nas camadas mais inferiores, que se pode confirmar com o Figura 9-C, ocorre a libertação do fósforo (P) da camada sedimentar tornando-se num ambiente de anoxia, uma vez que existe uma grande procura de oxigénio nas camadas de água estratificadas (Kim, et al., 2019).

Segundo O'Neil (2011), modelos empíricos preveem que, em ecossistemas temperados, as comunidades de fitoplâncton irão ser potencialmente dominadas por cianobactérias caso as concentrações de fósforo total estejam entre os valores de aproximadamente 100 a 1000 $\mu\text{g/L}$. Ao analisar Figura 11-B verifica-se que entre o meio e o fundo da albufeira, a partir do eixo de 0,10 mg/L, os três locais apresentam resultados dentro desse limite, sendo que 1 mg/L corresponde a 1000 $\mu\text{g/L}$.

4.1.2. Correlação entre os Parâmetros Físico-Químicos nas Plataformas

A partir da análise da Tabela 7 verifica-se que, nos três locais em Setembro de 2017, as variáveis físico-químicas pH e condutividade possuem correlações fortes

proporcionais, isto é, quando uma variável aumenta a outra também aumenta. O pH ainda possui outra correlação forte com o fósforo total, mas é uma correlação inversamente proporcional, isto é, quando uma variável aumenta a outra diminui. Também foi possível observar que a condutividade possui correlações proporcionais fortes com a turbidez e o azoto total, podendo também se correlacionar com a turbidez e o azoto total. A variável do oxigénio dissolvido tem uma correlação inversamente proporcional forte com o fósforo dissolvido, bem como o fósforo total com a temperatura.

Tabela 7 – Correlação entre todos os parâmetros Físico-Químicos em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos.

	pH	Condutividade	Oxigénio Dissolvido	Turbidez	Nitratos	Nitritos	Azoto Total	Fosfatos	Fósforo Total	Temperatura
pH	1.000									
Condutividade	-0.174	1.000								
Oxigénio Dissolvido	0.772	0.049	1.000							
Turbidez	-0.183	0.833	-0.429	1.000						
Nitratos	-0.583	0.450	-0.543	0.633	1.000					
Nitritos	-0.380	-0.034	-0.147	-0.169	0.321	1.000				
Azoto Total	0.067	0.800	0.257	0.867	0.450	-0.042	1.000			
Fosfatos	-0.517	0.500	-0.486	0.550	0.650	0.042	0.450	1.000		
Fósforo Total	-0.850	0.633	-0.714	0.417	0.683	0.489	0.367	0.700	1.000	
Temperatura	0.492	-0.533	0.165	0.050	-0.317	-0.582	0.033	-0.550	-0.767	1.000

4.2. Variáveis Biológicas e Moleculares em Setembro de 2017

Na Tabela 8 estão apresentados os valores medianos, mínimos e máximos para as diferentes plataformas, para a Clorofila *a* e variáveis moleculares, considerando todas as profundidades analisadas juntamente.

Tabela 8 – Resultados dos parâmetros Biológicos e Moleculares [Mediana (mínimo- máximo)], nas diferentes plataformas, assim como valores de *p* resultantes do teste Kruskal-Wallis (* *p* < 0,05). Os valores a negrito representam os valores medianos mais elevados e, na coluna das Diferença entre Plataformas, as diferenças significativas) (n=21)

Parâmetro (unidades)	Lucefécit	Mourão	Montante	Diferenças entre Plataformas (valor <i>p</i>)
16S Ciano (ng/μL)	2,95 (0,00 – 3,17)	4,10 (3,74 – 4,17)	4,41 (4,05 – 4,59)	0,000352 *
<i>mcyA</i> (ng/μL)	0,00 (0,00 – 0,00)	2,63 (0,00 – 3,05)	2,69 (0,00 – 3,01)	0,010007 *
<i>mcyB</i> (ng/μL)	0,00 (0,00 – 0,00)	2,80 (2,68 – 3,23)	3,01 (2,75 – 3,65)	0,000657 *
<i>mcyE/nda</i> (ng/μL)	0,00 (0,00 – 0,00)	3,07 (0,00 – 3,60)	3,03 (0,00 3,29)	0,000912 *
[DNA] (ng/μL)	128,5 (42,5 – 1227,0)	22,0 (3,5 – 23,0)	8,9 (7,1 – 26,4)	0,00076 *
Clorofila <i>a</i> (mg/m ³)	63,1 (5,8 – 69,9)	30,9 (0,3 – 33,5)	6,7 (0,2 – 7,6)	0,021336 *

Com base nos resultados da Tabela 8, podemos verificar que todas as variáveis apresentam diferenças significativas entre plataformas.

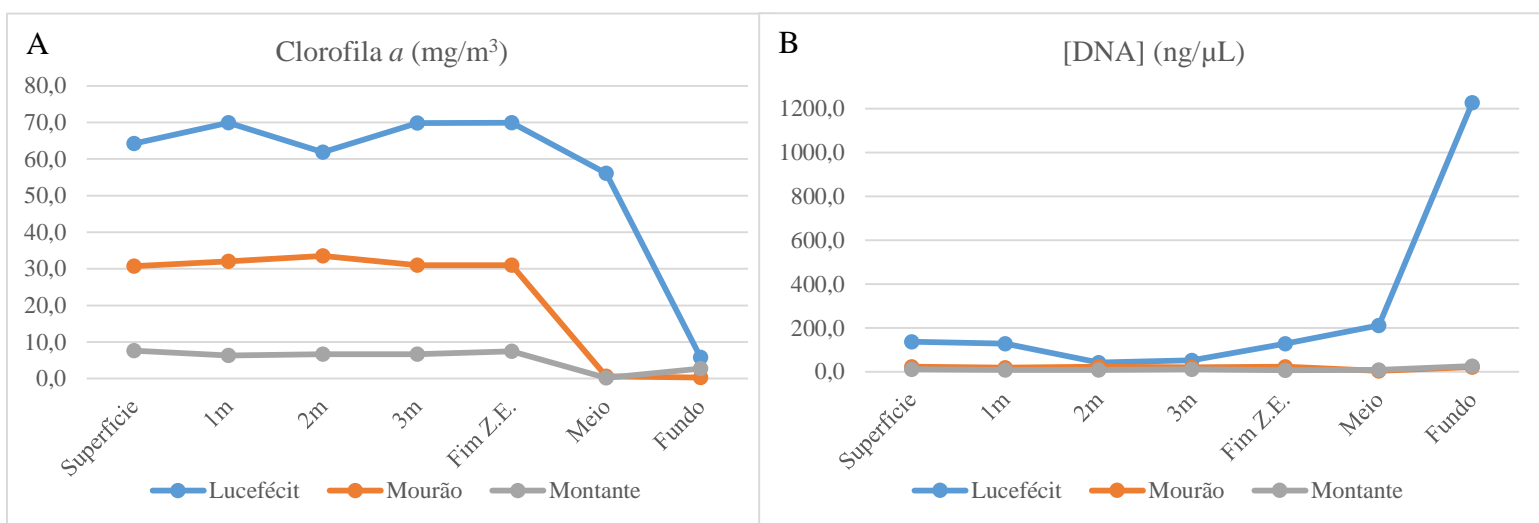


Figura 12 - Representação gráfica dos parâmetros Biológico e Molecular, a Clorofila *a* (A) e a Concentração do DNA (B). Os parâmetros estão representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

A clorofila *a*, é considerada o principal pigmento fotossintético presente nas células das Cianobactérias. A sua análise é realizada como um método que permite estimar o crescimento e desenvolvimento da comunidade dos fitoplâncton e, apesar do seu conteúdo nas células ser variável devido à disponibilidade de luz solar, também é possível estimar a ocorrência de *blooms* quando as concentrações de clorofila *a* são superiores a 40 μg/L (Bbalali, et al., 2013). Ao observar os resultados no Figura 12-A é

possível verificar que em Lucefécit os valores são sempre superiores a 40 $\mu\text{g/L}$ na maioria das profundidades, sendo que 1 $\mu\text{g/L}$ é igual a 1 mg/m^3 . O mesmo não acontece em Mourão e Montante. Ainda assim, como era de esperar, verificou-se uma diminuição da concentração de clorofila *a* produzida a partir da zona eufótica, em todos os locais, uma vez que a intensidade luminosa vai diminuindo gradualmente com a profundidade.

Com o Figura 12-B, observa-se a evolução da concentração do DNA tendo valores superiores também em Lucefécit, com um aumento significativo no fundo. Ainda assim, não nos indica que essa concentração de DNA seja correspondente a Cianobactérias, sendo que os valores são da concentração de DNA total ([DNA]).

Para complementar com mais informação avaliámos os resultados do 16S rRNA que é específico para Cianobactérias. Os resultados presentes na tabela 8 e os Figuras 12-A e B e 13 foram equiparados e averiguou-se que, apesar de ter havido um aumento significativo da concentração de DNA no fundo da albufeira em Lucefécit, não se confirma o mesmo para o 16S Ciano. Ainda assim comprovou-se a presença de Cianobactérias nas restantes profundidades e nos três locais.

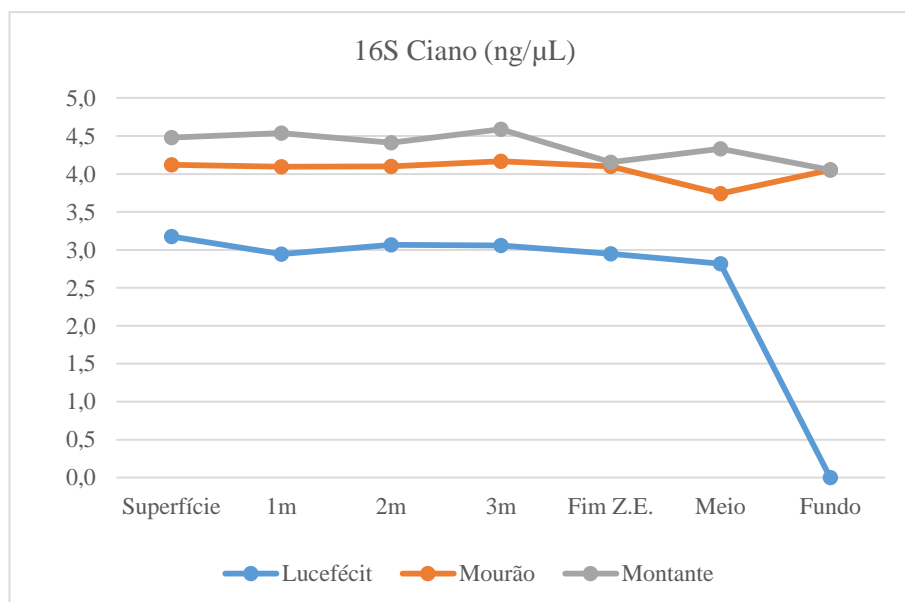


Figura 13 - Representação gráfica do parâmetro Molecular, 16S Ciano. O parâmetro está representados ao longo das profundidades: Superfície, Meio e Fundo nos três locais de estudo

Uma vez confirmada a presença de Cianobactérias nas três plataformas, analisou-se se são potencialmente produtoras de Microcistinas, para isso avaliaram-se os dados da tabela 8 e os gráficos correspondentes aos locais com os genes *mcyA*, *mcyB*, e *mcyE/nda* (Figuras 14 e 15). O resultado mais relevante é que as Cianobactérias detetadas em Lucefécit não são potencialmente produtoras de Microcistinas, uma vez que não apresentaram nenhum gene responsável para a produção desta toxina. O mesmo resultado já não se verifica nas restantes plataformas, onde se observou a presença de Cianobactérias com potencialidade de serem produtoras de Microcistinas, praticamente toda a coluna de água.

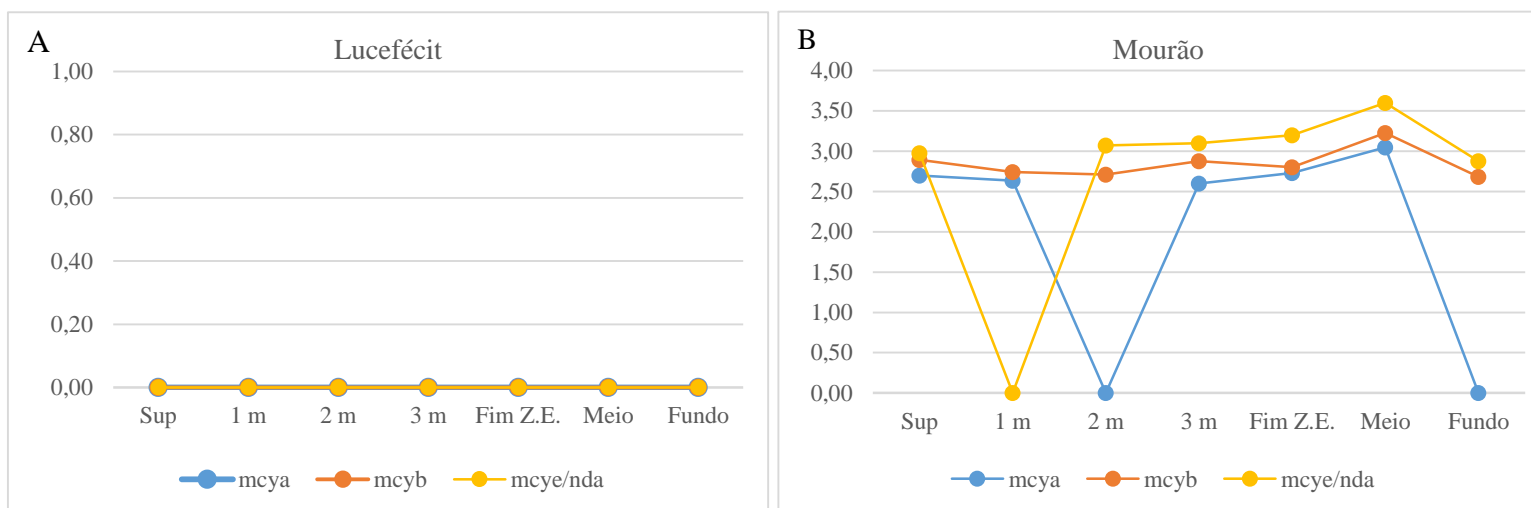


Figura 14 - Representação gráfica da evolução dos genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyE/nda* ao longo da profundidade em Lucefécit (A) e Mourão (B)

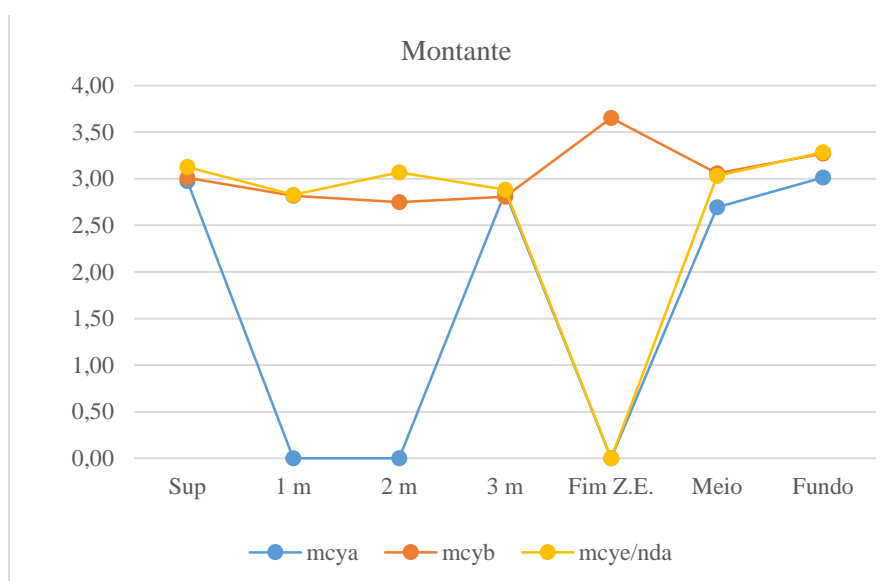


Figura 15 - Representação gráfica da evolução dos genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyE/nda* ao longo da profundidade em Montante

4.2.1. Correlação entre os Parâmetros Biológicos e Moleculares nas Plataformas

A partir da análise da Tabela 9 verifica-se que, nos três locais em Setembro existem correlações inversamente proporcionais fortes entre as variáveis 16S Ciano e a [DNA], indicando que quando há uma diminuição da variável 16S Ciano a [DNA] aumenta, e vice-versa. Onde é possível observar mais nas figuras 12B e 13 no fundo da albufeira. A variável 16S Ciano apresenta correlações proporcionais moderadas e fortes com todos os genes responsáveis pela produção de Microcistinas, indicando que, quando presentes estes genes, as Cianobactérias são potencialmente produtoras de Microcistinas. A [DNA] apresenta uma correlação inversamente proporcional moderada a forte com todos os genes *mcy*.

Tabela 9 - Correlação entre todos os parâmetros Biológicos e Moleculares em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos.

	16S Ciano					
16S Ciano	1.000000	[DNA]				
[DNA]	-0.795322	1.000000	Clorofila <i>a</i>			
Clorofila <i>a</i>	-0.454044	0.576536	1.000000	<i>mcyA</i>		
<i>mcyA</i>	0.544458	-0.562430	-0.426766	1.000000	<i>mcyB</i>	
<i>mcyB</i>	0.711684	-0.795372	-0.603594	0.778246	1.000000	<i>mcyE/nda</i>
<i>mcyE/nda</i>	0.600835	-0.625062	-0.566610	0.793589	0.765116	1.000000

4.2.2. Correlação entre os Parâmetros Biológicos e Moleculares com os Parâmetros Físico-Químicos

A síntese das cianotoxinas é influenciada pelos parâmetros físico-químicos e do local de estudo onde é feita a amostragem, havendo evidências de que as alterações nos ecossistemas aquáticos como o aumento da temperatura, adição excessiva de nutrientes, aumento da concentração de CO₂, entre outros, irão afetar a dominância e a toxicidade das Cianobactérias (Churro & Valério, 2015; O'Neil, et al., 2011). Assim sendo, foi realizado um estudo de correlação entre os fatores físico-químicos com as componentes biológicas e moleculares.

A partir dos resultados obtidos dessas análises e dos parâmetros biológicos e moleculares (Tabela 10) verificou-se que o azoto total e a turbidez são os parâmetros que

usufruem de correlações mais fortes e significativas com os genes 16S Ciano, *mcyB*, *mcyE/nda* e com a [DNA]. Sendo que a única correlação forte é proporcional entre a variável azoto total e a [DNA].

Também se observa correlações proporcionais fortes entre o pH e o oxigénio dissolvido com a clorofila *a*. Já com os nitratos observa-se uma correlação inversamente proporcional com o gene *mcyA*.

Também se notou que, para além de mediana, a temperatura e o 16S Ciano têm uma correlação significativa, o que permite corroborar com o que várias investigações afirmam sobre a influência da temperatura nas características físicas dos ambientes aquáticos de modo a favorecerem a taxa de produção das cianobactérias, principalmente a temperaturas aproximadas ou superiores a 20°C (O'Neil, et al., 2011).

Tabela 10 - Correlação entre os parâmetros Biológicos e Moleculares com os parâmetros Físico-Químicos da água em Setembro de 2017. Os resultados preenchidos a Vermelho indicam que existe uma correlação Forte entre essas variáveis. Os que estão preenchidos a Amarelo apresentam uma correlação Mediana. A Verde estão preenchidos os resultados das variáveis com uma correlação Fraca. Os resultados sem preenchimento indica que não apresentam nenhuma correlação. Por fim, os valores a negrito representam os valores significativos.

	pH	Condutividade	Oxigénio Dissolvido	Turbidez	Nitratos	Nitritos	Azoto Total	Fosfatos	Fósforo Total	Temperatura
16S Ciano	-0.1969	-0.6267	-0.2552	-0.8000	-0.5667	-0.0844	-0.8333	-0.2500	-0.3833	0.5459
[DNA]	0.3674	0.6434	0.3815	0.6667	0.3000	-0.0675	0.8500	0.2500	0.3167	-0.3004
Clorofila <i>a</i>	0.8671	0.0822	0.7921	0.3167	-0.2667	-0.3882	0.5667	-0.3000	-0.4833	0.2973
<i>mcyA</i>	-0.1681	-0.4998	-0.1898	-0.6891	-0.7227	-0.1915	-0.6723	-0.2941	-0.4538	0.1085
<i>mcyB</i>	-0.3760	-0.4890	-0.2961	-0.7782	-0.5690	0.1059	-0.7280	-0.1590	-0.1925	0.0944
<i>mcyE/nda</i>	-0.3410	-0.5815	-0.4817	-0.7459	-0.6272	-0.0515	-0.7798	-0.3051	-0.2882	0.0884

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar o *bloom* de Microalgas que ocorreu em setembro de 2017, em 3 locais distintos da Albufeira de Alqueva, e ao longo da coluna de água, em termos físico-químicos, biológicos e moleculares.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos mostram que a toda a albufeira se encontra estratificada, com diferenças entre a superfície e o fundo.

Segundo a DQA, para fazer uma avaliação do Estado Trófico de uma massa de água, temos que ter vários parâmetros em consideração, sendo que para as albufeiras do Sul de Portugal são considerados as concentrações de Nitratos, Fósforo Total e Clorofila *a* (INAG, 2009). Os resultados aqui apresentados mostram que os Nitratos se encontram muito inferiores ao limite para o estado trófico, no entanto, o mesmo não se pode dizer para o Fósforo Total. Segundo INAG (2009), o limite para a fronteira entre o Bom Potencial Ecológico de uma albufeira é 0,07 mg/L de Fósforo Total e o limite para o Estado Trófico é de 0,035 mg/L. Com base nos resultados, podemos verificar que no momento do *bloom* os valores de Fósforo Total estão sempre acima do limite para o Estado Trófico, com exceção do valor mínimo em Mourão (0,030 mg/L). Os valores medianos de Fósforo Total em Lucefécit e Montante ultrapassam a fronteira do Bom Potencial Ecológico (0,078 e 0,087 mg/L, respetivamente).

Relativamente à Clorofila *a*, para as albufeiras do Sul de Portugal, está estabelecido o limite para o Estado Trófico 8 mg/m³ e para a fronteira do Bom Potencial Ecológico 9,5 mg/m³ (Instituto da Água, I.P. (INAG), 2009). Tanto em Lucefécit como em Mourão os valores de Clorofila *a* ultrapassam a fronteira para o Bom Estado Ecológico e o limite para o Estado Trófico (63,1 e 30,9 mg/m³, respetivamente).

Todos estes parâmetros acima analisados mostram que a albufeira se classifica como sendo Mesotrófico.

No que concerne à toxicidade, do nosso conhecimento, não houve nenhum estudo em que analisassem a “expressão relativa” de Cianobactérias e genes produtores de toxinas em profundidade. O que neste bloom pudemos observar, foi que, em Lucefécit, apesar dos elevados níveis de Clorofila *a* e de Fósforo Total, as Cianobactérias ali existentes naquele momento, não continham os genes responsáveis pela produção de Microcistinas. O

mesmo não se observou nos outros 2 locais, onde havia uma presença de genes produtores de Microcistinas ao longo de toda a coluna de água. Para conseguirmos ter uma melhor explicação destes resultados, teríamos de recorrer a uma análise mais detalhada de toda a comunidade fitoplanctónica, por exemplo, identificação por Microscopia Ótica, uma vez que, a ocorrência e as concentrações de Cianotoxinas podem ser previstas a partir da abundância de seus táxons produtores (Dolman, et al., 2012). As concentrações totais de toxinas na coluna de água também dependem do conteúdo de toxinas celulares dos táxons produtores, que podem ser afetados por parâmetros ambientais como luz, temperatura e nutrientes (Sivone, 1990; Wiedner, et al., 2003).

É difícil identificar os produtores de Cianotoxinas porque cada grupo de toxinas pode ter um número de táxons produtores diferentes, cada taxa pode ter estirpes tóxicas e não-tóxicas que podem ou não coexistir ao mesmo tempo, e o conteúdo de toxinas celulares de estirpes tóxicas específicas pode variar devido às condições ambientais (Kaebernick & Neilan, 2001)

Como perspetivas futuras seria importante caracterizar mais *blooms* que tenham ocorrido na mesma albufeira, nos mesmos locais e na mesma altura do ano, de modo a encontrar um padrão que nos permita definir as principais causas da ocorrência destes *blooms*.

Bibliografia

- Alvarenga, D. O., Fiore, M. F. & Varani, A. M., 2017. A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics. *Frontiers in Microbiology*, 8(809), pp. 1-16.
- Amand, A. L. S., 2012. Part 10000 - Biological Examination. Em: *Standard Methods - For the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federations, pp. 12000-13000.
- Apeldoorn, M. E. v., Egmond, H. P. v., Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I., 2007. Toxins of Cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, Volume 51, pp. 7-60.
- Bbalali, S., Hoseini, S. A., Ghorbani, R. & Kordi, H., 2013. Relationships between Nutrients and Chlorophyll a Concentration in the International Alma Gol Wetland, Iran. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 4(3), pp. 1-5.
- Berg, M. & Sutula, M., 2015. *Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta*, s.l.: Southern California Coastal Water Research Project Technical Report 869.
- Bortoli, S. & Pinto, E., 2015. Capítulo 21 - Cianotoxinas: Características Gerais, Histórico, Legislação e Métodos de Análise. Em: *Ecologia de reservatórios e interfaces*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pp. 321-339.
- Brandão, E. T. P., 2008. *Cianobactérias e Saúde Pública no Brasil*. Lisboa: Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências.
- Carmichael, W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 72, pp. 445-459.
- Carmichael, W. W., 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, Volume 270, pp. 78-84.
- Carmichael, W. W. & Boyer, G. L., 2016. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae*, Volume 54, pp. 194-212.
- Carvalho, M. d. C., Agujaro, L. F., Pires, D. A. & Picoli, C., 2013. *Manual de Cianobactérias Planctônicas: Legislação, Orientações para o Monitoramento e Aspectos Ambientais*. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.
- Cheung, M. Y., Liang, S. & Lee, J., 2013. Toxin-producing Cyanobacteria in Freshwater: A Review of the Problems, Impact on Drinking Water Safety, and Efforts fo Protecting Public Health. *Journal of Microbiology*, Volume 51, pp. 1-10.
- Churro, C. & Valério, E., 2015. Abordagem Multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas. *Observações Boletim Epidemiológico - Artigos Breves_Saúde Ambiental*, pp. 19-22.

Codd, G. A., Morrison, L. F. & Metcalf, J. S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 203, pp. 264-272.

Dantas, A., 2016. *G1 - Caruaru e Região*. [Online] Available at: <http://g1.globo.com/pe/caruaru-regiao/noticia/2016/02/tragedia-da-hemodialise-que-deixou-quase-60-mortos-completa-20-anos.html> [Acedido em Junho 2018].

Dolman, A. et al., 2012. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS ONE*, 7(6).

Ehrenberg, C. G., 1838. Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. *Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur.*, pp. i-xviii.

Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva, S.A., 2019. *EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva, S.A.*. [Online] Available at: <https://www.edia.pt/pt/> [Acedido em 9 Agosto 2019].

Fernandes, A. J. d. S., 2009. *Indicadores de Stress Oxidativo em Estirpes de Cianobactérias e Microalgas*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.

Fernandes, S. d. S., 2008. *Biodisponibilidade de Cianotoxinas em Bivalves*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Ferrão-Filho, A. d. S., Molica, R. & Azevedo, S. M. F. O., 2014. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. *Oecologia Australis*, pp. 225-228.

Ferreira, M., 2012. *A Importância do Alqueva na Região Alentejana*. Coimbra: Impactum - Coimbra University Press.

Fragoso, R., Bushenkov, V. & Marques, C., 2008. Usos Múltiplos da Água no Empreendimento de Alqueva: Uma Abordagem Multi-Objectivo. *Investigação Operacional*, Volume 28, pp. 119-131.

Francis, G., 1878. Poisonous Australian Lake. *1878 Nature Publishing Group*, pp. 11-12.

Glick, B. R., Pasternack, J. J. & Patten, C. L., 2010. Chapter 4 - Chemical Synthesis, Amplification, and Sequencing of DNA. Em: *Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington DC, USA: ASM Press, pp. 108-117.

Gomes, D. R. P., 2013. *Pesquisa de Cianobactérias, Cianotoxinas e Bactérias Patogénicas, em Suplementos Alimentares*. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Halpern, M. J. & Quintas, A., 2008. A Bioquímica e a Vida. Em: *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. Lisboa: Lidel, pp. 1-15.

- Hisbergues, M. et al., 2003. PCR-Based Identification of Microcystin-Producing Genotypes of Different Cyanobacterial Genera. *Arch. Microbiol.*, Volume 180, pp. 402-410.
- Ibelings, B. W. & Chorus, I., 2007. Accumulation of Cyanobacterial Toxins in Freshwater "Seafood" and its Consequences for Public Health: A Review. *Environmental Pollution*, Volume 150, pp. 177-192.
- Instituto da Água, I.P. (INAG), 2009. Critérios para a classificação do estado das massas de água superficiais – Rios e Albufeiras, Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Instituto da Água, I.P., 2009. *Manual para a Avaliação da Qualidade Biológica da Água em Lagos e Albufeiras Segundo a Directiva Quadro da Água*. Instituto da Água, I.P. ed. Lisboa: Ministério do Ambiente, do Ornamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- International Joint Commission by the Health Professionals Advisory Board, 2017. *Human Health Effects of Cyanobacterial Toxins in the Great Lakes Region; A Science and Monitoring Assesment*, Estados Unidos da América: s.n.
- Jungblut, A.-D. & Neilan, B. A., 2006. Molecular Identification an Evolution of the Cyclic Peptid Hepatotoxins, Microcystin and Nodularin, Synthetase Genes in Three Orders of Cyanobacteria. *Arch Microbiol*, Volume 185, pp. 107-114.
- Kaebnick, M. & Neilan, B., 2001. Ecological and Molecular Investigations of Cyanotoxin Porduction. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 35, pp. 1-9.
- Kaneko, T. et al., 1995. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence Features in the 1 Mb Region from Map Positions 64% to 92% of the Genome. *DNA Research*, 2(4), pp. 153-166.
- Kim, S. et al., 2019. Analysis of Environmental Factors Associated with Cyanobacterial Dominance after River Weir Installation. *Water*, 1163(11), pp. 1-24.
- Koetsier, G. & Cantor, E., 2019. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New England BioLabs*, pp. 1-8.
- Macário, I. P. E. et al., 2016. Cianobactérias: problemática e estratégias de gestão em sistemas dulçaquícolas com uso recreativo. *Captar - Ciência e Ambiente para todos*.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Walter, Z. & Zalewski, M., 2003. Natural Toxins from Cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia*, Volume 45, pp. 9-20.
- Menezes, C., Churro, C. & Dias, E., 2017. Risk Levels of Toxic Cyanobacteria in Portuguese Recreational Freshwaters. *Toxins*, Volume 9, pp. 1-17.
- Merel, S. et al., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, Volume 59, pp. 303-327.

Microbial, 2009. Pathogen Detection Systems by Real Time PCR - Results Interpretation Guide. *Microbial*, pp. 1-15.

Miranda, M. A. d. S., 2014. *Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais – Brasil*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Morais, M. et al., 2017. Metodologias Inovadoras para a Previsão da Qualidade Ecológica em Reservatórios (Alqueva, Sul de Portugal). *Revista Eletrônica do Prodepa*, Volume 11, pp. 68-78.

Moreira, C., Ramos, V., Azevedo, J. & Vasconcelos, V., 2014. Methods to Detect Cyanobacteria and their Toxins in the Environment. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Moreno, I. M. et al., 2012. Toxinas de Cianofíceas. Em: A. M. Cameán & M. Repetto, edits. *Toxicología Alimentaria*. Madrid: Díaz de Santos, pp. 169-189.

Neilan, B. A. et al., 1997. rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), pp. 693-697.

Newcombe, G. et al., 2010. *Management Strategies for Cyanobacteria (Blue-Green Algae): A Guide for Water Utilities*. Australia: Water Quality Research Australia Limited 2010.

Nonneman, D. & Zimba, P. V., 2002. A PCR-Based Test to Assess the Potential for Microcystin Occurrence in Channel Catfish Production Ponds. *Journal of Phycology*, 38(1), pp. 230-233.

Nozzi, N. E., Oliver, J. W. K. & Atsumi, S., 2013. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, Volume 1, pp. 1-6.

Oliveira, M. M. d., Filho, M. V. s., Bastos, J. d. C. & Neves, M. H. C. B., 2010. Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, Volume 4, pp. 57-80.

Oliveira, W. d. C. et al., 2013. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, Volume 2, pp. 49-67.

Olson, N. D. & Morrow, J. B., 2012. DNA Extract Characterization Process for Microbial Detection Methods Development and Validation. *BMC Research Notes*, 668(5), pp. 1-14.

O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A. & Gobler, C. J., 2011. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, Volume 14, pp. 313-334.

Oswald, N., 2017. *Quick Reference: Determining DNA Concentration and Purity*. [Online]

Available at: <https://bitesizebio.com/25270/quick-reference-determining-dna->

concentration-purity/

[Acedido em 1 10 2019].

Ouahid, Y., Pérez-Silva, G. & del Carmo, F., 2005. Identification of Potentially Toxic Environmental Microcystis by Individual and Multiple PCR Amplification of Specific Microcystin Synthetase Gene Regions. *Environ. Toxicol.* , 20(3), pp. 235-242.

Paerl, H. W. & Paul, V. J., 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, Volume 46, pp. 1349-1363.

Pandey, V. D., Pandey, A. & Sharma, V., 2013. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, Volume 2, pp. 89-97.

Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2000. Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

Petcheneshsky, T., Benítez, R., Hansen, M. & Titto, E. d., 2011. La Calidad del agua: un determinante esencial de la salud. Inportancia del compromiso local. Em: M. d. S. d. I. Nación, ed. *Cianobacterias - Como Determinantes Ambientales de la Salud*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación, pp. 9-20.

Quintas, A., 2008. Glúcidos: Estrutura, Função e Metabolismo. Em: *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. Lisboa: Lidel, pp. 317-431.

Rastogi, R. P., Madamwar, D. & Icharoensakdi, A., 2015. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6, pp. 1-22.

Regueiras, A. V. B., 2009. *Comparação de métodos de identificação e quantificação de cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio Tâmega)*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. & Clesceri, L. S., 2012. *Standard Methods - For the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation .

Salgado, R. & Barrenho, J., 2017. *ALOP - Alentejo Observation and Prediction Systems*. [Online]

Available at: <http://www.alop.ict.uevora.pt/>
[Acedido em 03 09 2019].

Sant'Anna, C. L. et al., 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, Volume 126, pp. 251-265.

Sciuto, K. & Moro, I., 2015. Cyanobacteria: the bright and dark sides of charming group. *Biodivers Conserv*.

Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K. & Rai, A. K., 2011. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *J Appl Phycol*, Volume 23, pp. 1059-1081.

Silva, S. C. F. d., 2012. *Ecotoxicologia de Cianobactérias no Canal Principal do Baixo Rio Tapajós, Santarém, Pará, Amazônia, Brasil*. Santarém, Pará: Universidade Federal do Oeste do Pará.

Siqueira, D. B. & Oliveira-Filho, E. C., 2008. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde*, Volume 3, pp. 109-127.

Siqueira, D. B. & Oliveira-Filho, E. C., 2008. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde*, Volume 3, pp. 109-127.

Sivone, K., 1990. Effects of Light, Temperature, Nitrate, Orthophosphate, and Bacteria in Growth of and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, Volume 56, pp. 2658-2666.

Sivonen, K. & Jones, G., 1999. Chapter 3. Cyanobacterial Toxins. Em: I. Chorus & J. Bartram, edits. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. s.l.:WHO.

Skalar Analytical B. V., 2010. *Skalar San Plus Analyzer - General Information*. Holanda: Skalar Analytical B. V..

Sobiechowska-Sasim, M., Stoń-Egiert, J. & Kosakowska, A., 2014. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *J Appl Phycol*, Volume 26, pp. 2065-2074.

Svrcek, C. & Smith, D., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.*, Volume 3, pp. 155-185.

Testai, E. et al., 2016. *Review and Analysis of Occurrence, Exposure and Toxicity of Cyanobacteria Toxins in Food*, Itália e França: European Food Safety Authority.

Thuret, G., 1875. Essai de classification des Nostochinées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, pp. 372-382.

Valério, E. M. P., 2008. *Molecular Approaches In Cyanobacteria: From Detection and Diversity to DNA-based Biosensors*. Lisboa: Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.

Vasconcelos, V., 2018. *Studies of Cyanobacteria in Portugal, State of the Art and Future Perspectives*. Évora, s.n.

Vasconcelos, V. M. d. O. e., 1995. *Toxicologia de cianobactérias - Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Vermaas, W. F., 2001. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1-7.

Videira, A., 2011. Capítulo 6 - Reação em Cadeia da Polimerase. Em: A. Videira, ed. *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda, pp. 75-78.

Wiedner, C. et al., 2003. Effects of Light, on Microcystin Content of Microcystis Strain PCC 7806. *Applied and Environment Microbiology*, Volume 69, pp. 1475-1481.

Wood, R., 2016. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. *Environment International*, Volume 91, pp. 276-282.

Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M. & Prepas, E. E., 2005. Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, Volume 8, pp. 1-37.