

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A RECUPERAÇÃO E MELHORIA DE GESTÃO DE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS NO ÂMBITO DA IMPLEMENTAÇÃO DA DIRETIVA QUADRO DA ÁGUA

Ajuste Directo Nº 46/DRA/2014

RF

Relatório Final

CIBIO Açores
Departamento de Biologia
Universidade dos Açores
Ponta Delgada, Dezembro 2016

Coordenador: Vítor Gonçalves

Equipa: Afonso Prestes, Allan Souza, Amélia Fonseca, Ana Cristina Costa, Andréanne Dallaire, Helena Marques, Guilherme Gea, Joan Ollé, José Azevedo, Julie Camille-Riva, Miguel Matias, Pedro Raposeiro e Rita Cordeiro



Região Autónoma dos Açores
Secretaria Regional da Agricultura e Ambiente
Direção Regional do Ambiente



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional

Forma de citação deste relatório:

Gonçalves, V., Raposeiro, P.M., Cordeiro, R., Fonseca, A., Souza, A., Azevedo, J., Matias, M., Marques, H. e Costa, A.C., 2016. *Desenvolvimento de metodologias para a recuperação e melhoria de gestão de ecossistemas aquáticos no âmbito da implementação da Diretiva Quadro da Água. Relatório Final – RF*. CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 75 pp.

Índice

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE TABELAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
PREÂMBULO	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO DAS MASSAS DE ÁGUA INTERIORES DE SUPERFÍCIE DA REGIÃO HIDROGRÁFICA DOS AÇORES.....	11
2.1. INTRODUÇÃO.....	11
2.2. METODOLOGIA	12
2.3. RESULTADOS.....	15
2.4. DISCUSSÃO.....	29
2.5. PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTADO ECOLÓGICO DAS MASSAS DE ÁGUA INTERIORES DE SUPERFÍCIE DA REGIÃO HIDROGRÁFICA DOS AÇORES	30
3. ESTUDO PILOTO PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE DNA AMBIENTAL PARA A MONITORIZAÇÃO DAS COMUNIDADES PISCÍCOLAS NAS LAGOAS DOS AÇORES.....	34
3.1. INTRODUÇÃO.....	34
3.2. METODOLOGIA	35
3.2.1. <i>Recolha de DNA</i>	35
3.2.2. <i>Amostragem da fauna piscícola</i>	36
3.3. RESULTADOS.....	36
3.4. DISCUSSÃO.....	38
4. ESTUDO DO POTENCIAL CIANOTÓXICO EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DO ARQUIPÉLAGO DOS AÇORES ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES. IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ALERTA PARA A PREVENÇÃO DE RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	39
4.1. INTRODUÇÃO.....	39
4.2. METODOLOGIA	41
4.2.1. <i>Amostragens</i>	41
4.2.2. <i>Extração e quantificação de DNA</i>	41
4.2.3. <i>Confirmação da presença de DNA de cianobactérias</i>	41
4.2.4. <i>Amplificação por PCR de genes produtores de cianotoxinas</i>	43
4.3. RESULTADOS.....	44
4.3.1. <i>Quantificação de DNA extraído</i>	44
4.3.2. <i>Deteção do gene produtor de ficocianinas e do gene 16S rDNA</i>	47
4.3.3. <i>Deteção de genes produtores de microcistinas</i>	49
4.3.4. <i>Deteção de genes produtores de neurotoxinas</i>	51
4.3.4. <i>Deteção de genes produtores de cilindrospermopsinas</i>	53
4.4. DISCUSSÃO.....	53
4.5. PROPOSTA DE SISTEMA DE ALERTA PARA A PREVENÇÃO DE RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA RESULTANTES DA PRESENÇA DE CIANOTOXINAS NAS MASSAS DE ÁGUA INTERIORES DE SUPERFÍCIE DA REGIÃO HIDROGRÁFICA DOS AÇORES.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	69

Índice de Tabelas

TABELA 1. RESUMO DOS DADOS DISPONÍVEIS NA BASE DE DADOS RELATIVOS À CATEGORIA DE MASSAS DE ÁGUA LAGOAS.....	13
TABELA 2. RESUMO DOS DADOS DISPONÍVEIS NA BASE DE DADOS RELATIVOS À CATEGORIA DE MASSAS DE ÁGUA RIBEIRAS.....	13
TABELA 3. RIBEIRAS E AFLUENTES NA ILHA DE SÃO MIGUEL, E RESPECTIVOS CÓDIGOS, UTILIZADOS NAS ANÁLISES, TABELAS E GRÁFICOS APRESENTADOS NESTE CAPÍTULO.....	14
TABELA 4. RESULTADOS DA ANÁLISE TREE-WAY PERMANOVA DAS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS DAS RIBEIRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE.....	16
TABELA 5. RESULTADOS DA ANÁLISE RLQ POR EIXO E TOTAL.....	20
TABELA 6. CLASSIFICAÇÃO PERCENTUAL DENTRO DOS NÍVEIS DE EQR (ECOLOGICAL QUALITY RATIO) DAS RIBEIRAS E AFLUENTES DE LAGOAS DE SÃO MIGUEL PARA CADA UM DOS ÍNDICES INVESTIGADOS.	24
TABELA 7. VALORES DE REFERÊNCIA E FRONTEIRAS ENTRE ESTADOS DE QUALIDADE PARA AS RIBEIRAS DOS AÇORES COM BASE NO ELEMENTO BIOLÓGICO DIATOMÁCEAS BENTÓNICAS.....	32
TABELA 8. VALORES FRONTEIRA ENTRE ESTADOS DE QUALIDADE PARA AS RIBEIRAS DOS AÇORES COM BASE NO ELEMENTO BIOLÓGICO MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS.	33
TABELA 9. NÚMERO E TIPO DE REDES UTILIZADO EM CADA UMA DAS LAGOAS AMOSTRADAS.	36
TABELA 10. VALORES DE BIOMASSA ABSOLUTA (GRAMAS), BIOMASSA RELATIVA (GRAMAS/HECTARE) E ABUNDÂNCIA (NUMERO DE INDIVÍDUOS) DAS ESPÉCIES CAPTURADAS NAS LAGOAS CANÁRIO, EMPADADAS NORTE E RASA DAS SETE CIDADES.....	37
TABELA 11. VALORES DE BIOMASSA ABSOLUTA (GRAMAS), BIOMASSA RELATIVA (GRAMAS/HECTARE) E ABUNDÂNCIA (NUMERO DE INDIVÍDUOS) DAS ESPÉCIES CAPTURADAS NAS LAGOAS FOGO E VERDE.	37
TABELA 12. PARES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE CIANOTOXINAS E CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE CIANOBACTÉRIAS.	42
TABELA 13. COMPOSIÇÃO DO <i>MIX</i> DE REACÇÃO PARA O PAR DE <i>PRIMER 27F/809R</i> (COSTA 2011) ...	43
TABELA 14. COMPOSIÇÃO DO <i>MIX</i> DE REACÇÃO PARA OS PARES DE <i>PRIMERS M13/M14, M4/M5, AMTF/AMTR, CYNULFF/CYLNAMR</i> (KELLMANN ET AL., 2006; MANKIEWICZ-BOCZEC ET AL., 2011)	44
TABELA 15. DETECÇÃO POR ELETROFORESE DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS. N.A. NÃO AMOSTRADO; - DNA NÃO DETETADO; + DNA DETETADO.....	45
TABELA 16. RESULTADOS DA PCR COM O PAR DE <i>PRIMER</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PRODUTOR DE FICOCIANINAS (PC-IGS) E DO GENE 16S rDNA. - NÃO AMPLIFICADO; + AMPLIFICADO; N.A. NÃO ANALISADO.	49
TABELA 17. RESULTADOS DA PCR COM OS PARES DE <i>PRIMERS</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE MICROCISTINA. - NÃO AMPLIFICADO; + AMPLIFICADO; N.A. NÃO ANALISADO.	50
TABELA 18. RESULTADOS DA PCR COM OS PARES DE <i>PRIMERS</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE SAXITOXINA. - NÃO AMPLIFICADO; + AMPLIFICADO; NT NÃO TESTADO; N.A. NÃO AMOSTRADO.	52

TABELA 19. RESULTADOS DA PCR COM OS PARES DE <i>PRIMERS</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	
PRODUTORES DE ANATOXINA. - NÃO AMPLIFICADO; + AMPLIFICADO; NT NÃO TESTADO; N.A.	
NÃO AMOSTRADO.	53

Índice de Figuras

FIGURA 1. GRÁFICO DE ORDENAÇÃO BIDIMENSIONAL PCoA MOSTRANDO A HOMOGENEIDADE DOS DADOS DE MACROINVERTEBRADOS NAS RIBEIRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE.....	15
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE MACROINVERTEBRADOS INDICADORAS DO LOCAL NAS RIBEIRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE.	18
FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE MACROINVERTEBRADOS INDICADORAS DA ESTAÇÃO NAS RIBEIRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE.	19
FIGURA 4. RESULTADOS DA ANÁLISE RDA PARA AS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS COM BASE EM 24 VARIÁVEIS ABIÓTICAS EM 16 LOCAIS (A) E 3 ESTAÇÕES (B).....	19
FIGURA 5. DIAGRAMAS DA ANÁLISE RLQ PARA AS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS DAS RIBEIRAS SELECIONADAS. AS PONTUAÇÕES R E Q E OS VALORES CANÔNICOS SÃO APRESENTADOS DO LADO ESQUERDO E DIREITO DA FIGURA, RESPECTIVAMENTE. OS VALORES DOS EIXOS (EIGENVALUES) SÃO APRESENTADOS NO CANTO INFERIOR DIREITO.	20
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES SIGNIFICATIVAS ($P < 0,5$) IDENTIFICADAS PELO MÉTODO <i>FOURTH-CORNER</i> SOBRE O MAPA FACTORIAL DA ANÁLISE RLQ. AS ASSOCIAÇÕES POSITIVAS SIGNIFICATIVAS SÃO REPRESENTADAS POR LINHAS VERMELHAS ENQUANTO QUE AS ASSOCIAÇÕES NEGATIVAS SIGNIFICATIVAS NÃO REPRESENTADAS POR LINHAS AZUIS. OS TRAITS SÃO REPRESENTADOS POR CÍRCULOS E IDENTIFICADOS A NEGRITO. AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS SÃO REPRESENTADAS POR TRIÂNGULOS. OS VALORES DE P FORAM AJUSTADOS POR COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS USANDO O PROCEDIMENTO FDR. OS CÓDIGOS PARA OS TRAITS E PARA AS VARIÁVEIS SÃO INDICADOS NA TABELA A1 (ANEXOS).	21
FIGURA 7. CLASSIFICAÇÃO DE AFLUENTES E RIBEIRAS DE SÃO MIGUEL NOS NÍVEIS EQR (ECOLOGICAL QUALITY RATIO) DE ACORDO COM 8 DIFERENTES ÍNDICES. ARCOS AZUIS = EXCELENTE, ARCOS VERDES = BOM, ARCOS AMARELOS = RAZOÁVEL, ARCOS LARANJA = MEDÍOCRE, ARCOS VERMELHOS = MAU.	22
FIGURA 8. CLASSIFICAÇÃO DE AFLUENTES E RIBEIRAS DE SÃO MIGUEL NOS NÍVEIS EQR (ECOLOGICAL QUALITY RATIO) DE ACORDO COM 11 NÍVEIS DA ENTROPIA DE RÉNYI E O RÉNYI SCORE. ARCOS VERDES = BOM, ARCOS AMARELOS = RAZOÁVEL, ARCOS LARANJA = MEDÍOCRE, ARCOS VERMELHOS = MAU.	23
FIGURA 9. DIAGRAMA SANKEY LIGANDO AS RIBEIRAS ANALISADAS ATRAVÉS DE TODOS OS NÍVEIS DA ENTROPIA DE RÉNYI UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO DAS RIBEIRAS COM BASE NO RÁCIO DE QUALIDADE ECOLÓGICA DAS RESPECTIVAS COMUNIDADES DE MACROINVERTEBRADOS.	25
FIGURA 10. CLASSIFICAÇÃO EM NÍVEIS DE EQR (ECOLOGICAL QUALITY RATIO) DO ÍNDICE RÉNYI SCORE EM CADA UM DOS LOCAIS ANALISADOS (RIBEIRAS E AFLUENTES DE LAGOAS DE SÃO MIGUEL). PONTOS INDICAM OS DADOS BRUTOS, BARRAS INDICAM AS TENDÊNCIAS CENTRAIS, AS CURVAS REFEREM-SE À DENSIDADE SUAVIZADA, ENQUANTO OS RETÂNGULOS HORIZONTAIS INDICAM OS INTERVALOS DE REFERÊNCIA (INTERVALO DE MAIOR DENSIDADE BAYESIANO). ...	26
FIGURA 11. ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES DE MACROINVERTEBRADOS IDENTIFICADAS COMO INDICADORES DOS NÍVEIS DE EQR DETERMINADOS PELO RÉNYI SCORE (ANÁLISE MULTIPATT NO INDICSPEC PACKAGE DO CRAN-R).....	29
FIGURA 12. ESQUEMA CONCEPTUAL DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO NO ÂMBITO DA DIRETIVA-QUADRO DA ÁGUA/LEI DA ÁGUA (INAG, 2009). ESTADO ECOLÓGICO E ESTADO DA MASSA DE	

ÁGUA: E- EXCELENTE; B- BOM; R- RAZOÁVEL; MD- MEDÍOCRE; M- MAU. ESTADO QUÍMICO: B- BOM; I- INSUFICIENTE.	31
FIGURA 13. ELETROFORESE DE DNA TOTAL. M-MARCADOR 1 KB (SOLIS BioDYNE); 1-ENMI1015C; 2-ESMI1015C; 3-RSDMI1015C; 4-CNMI1015C; 5-RSCMI1015C; 6-STMI1015C; 7-FRMI1015C; 8-CPPI1015C; 9-CDPI1015C; 10-CRONTROLO NEGATIVO.....	46
FIGURA 14. ELETROFORESE DE DNA TOTAL. M-MARCADOR 1 KB (SOLIS BioDYNE); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-FNFO1015C; 7-CONTROLO NEGATIVO.....	46
FIGURA 15. ELETROFORESE DE DNA TOTAL. M-MARCADOR 1 KB (SOLIS BioDYNE); 1-RSCMI0216C; 2-RSDM0216C; 3-ESMI0216C; 4-ENMI0216C; 5-CNMI0216C; 6-SBMI0216C; 7-FRMI2016C; 8-CGMI0216C; 9-FGMI0216C; 10-VMI0216C; 11-AMI0216C; 12-CPPI0316C; 13-CDPI0316C; 14-FNFO0316C; 15- CONTROLO NEGATIVO.....	47
FIGURA 16. ELETROFORESE DE DNA TOTAL. M-MARCADOR 1 KB (SOLIS BioDYNE); 1-CGMI1016C; 2-RSDM1016C; 3-ESMI1016C; 4-ENMI1016C; 5-CNMI1016C; 6-SBMI1016C; 7-FRMI1016C; 8-RSCMI1016C; 9-FGMI1016C; 10-VMI1016C; 11-AMI1016C; 12-CPPI1016C; 13-CDPI1016C; 14-FNFO1016C; 15-STMI1016C; 16-CONTROLO NEGATIVO.....	47
FIGURA 17. ELETROFORESE APÓS PCR COM O PAR DE PRIMER CPCB-A (685BP). M-MARCADOR 100BP (SOLIS BioDYNE); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-STMI1015C; 7-RSDMI1015C; 8-RSCMI1015C; 9-ENMI1015C; 10-ESMI1015C; 11-CNMI1015C; 12-FRMI1015C; 13-CDPI1015C; 14-CPPI1015C; 15-FNFO1015C; 16-CONTROLO NEGATIVO.....	48
FIGURA 18. ELETROFORESE APÓS PCR COM OS PARES DE PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE MICROCISTINA (MCYA-297BP; MCYB-758BP; MCYD-647BP; MCYE-755BP; MCYG-425BP). M-MARCADOR 100BP (SOLIS BioDYNE); 1-SBMI1015C (MCYA); 2-CGMI1015C (MCYA); 3-FRMI1015C (MCYA); 4-FRMI1015C (MCYB); 5-VMI1015C (MCYD); 6-SBMI1015C (MCYD); 7-CGMI1015C (MCYD); 8-VMI1015C (MCYE); 9-SBMI1015C (MCYE); 10-CGMI1015C (MCYE); 11-FRMI1015C (MCYE); 12-VMI1015C (MCYG); 13-CGMI1015C (MYG); 14-CONTROLO NEGATIVO.....	50
FIGURA 19. ELETROFORESE APÓS PCR COM PARES DE PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE MICROCISTINA (MCYA-297BP; MCYG-425BP; MCYD-647BP; MCYC-674BP; MCYE-755BP; MCYB-758BP) E SAXITOXINA (SXTA-602BP). M-MARCADOR 1KB (SOLIS BioDYNE); 1-VMI0216C (MCYA); 2-FRMI0216C (MCYA); 3-VMI0216C (MCYG); 4-FRMI0216C (MCYG); 5-VMI0216C (MCYD); 6-VMI0216C (MCYC); 7-FRMI0216C (MCYC); 8-CGMI0216C (MCYC); 9-VMI0216C (MCYE); 10-FRMI0216C (MCYE); 11-CGMI0216C (MCYE); 12-FRMI0216C (MCYB); 13-VMI0216C (SXTA); 14-FNFO0316C (SXTA).	51
FIGURA 20. ELETROFORESE APÓS PCR COM O PAR DE PRIMER SXTA (602BP). M-MARCADOR 100BP (SOLIS BioDYNE); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-STMI1015C; 7-FRMI1015C; 8-CPPI1015C; 9-FNFO1015C; 10-CONTROLO POSITIVO; 11-CONTROLO NEGATIVO.	51
FIGURA 21. ELETROFORESE APÓS PCR COM O PAR DE PRIMER ANAC (366BP). M-MARCADOR 100BP (SOLIS BioDYNE); 1-SBMI1015C; 2-CGMI1015C; 3-FGMI1015C; 4-STMI1015C; 5-FRMI1015C; 6-FNFO1015C; 7-CONTROLO NEGATIVO.	52
FIGURA 22. ETAPAS DO SISTEMA DE ALERTA PARA A PREVENÇÃO DE RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA RESULTANTES DA PRESENÇA DE CIANOTOXINAS NAS LAGOAS DOS AÇORES POR MÉTODOS MOLECULARE	55

Preâmbulo

O presente relatório constitui o Relatório Final (RF) e contém o tratamento de dados e discussão de todos os resultados obtidos em cada um dos estudos incluídos na prestação de serviços relativa ao “Desenvolvimento de metodologias para a recuperação e melhoria de gestão de ecossistemas aquáticos no âmbito da implementação da Diretiva Quadro da Água” - Ajuste Directo nº 46/DRA/2014. Este relatório pretende dar cumprimento à alínea d) do ponto nº4 da cláusula segunda do contrato da referida prestação de serviços.

1. Introdução

Dando cumprimento aos objetivos ambientais impostos pela Diretiva Quadro da Água (DQA, EC Parliament and Council 2000), a rede de monitorização de vigilância das massas de água interiores de superfície de acordo com a metodologia normativa comunitária teve início em 2003, tendo-se atingido em 2008 a cobertura total da monitorização dessas massas de água na Região Hidrográfica Arquipélago dos Açores (RH9) (Pacheco et al. 2013). O principal objetivo da rede de monitorização de vigilância é avaliar o estado ecológico e químico de cada massa de água através da análise de indicadores de qualidade biológicos, hidromorfológicos, físico-químicos gerais e de poluentes específicos.

Para além das metodologias normativas gerais incluídas na DQA, vários grupos de trabalho a nível comunitário e nacional (e.g. WFD-CIS e INAG) produziram guias técnicos e recomendações com o objetivo de uma aplicação de métodos padronizados e intercalibrados entre os estados membros e regiões hidrográficas (e.g. WFD-CIS Working Group 2.3 2003; INAG 2009). Se ao nível das técnicas de amostragem e análises laboratoriais as metodologias podem ser facilmente padronizadas e adotadas de forma idêntica por todos os estados membros, já os elementos de qualidade e seus indicadores usados para a avaliação do estado ecológico são, frequentemente, específicos de cada região (Potapova & Charles 2007). A Região Hidrográfica Arquipélago dos Açores é, neste âmbito, muito particular pois possui especificidades que determinam a necessidade de desenvolver métodos específicos para a avaliação do estado ecológico das suas massas de água superficiais (Hughes & Malmqvist 2005; Gonçalves et al. 2008).

No decorrer de trabalhos anteriormente realizados foram detetadas importantes lacunas de conhecimento que condicionam, entre outros aspetos, a correta

implementação da DQA nos Açores, havendo necessidade de desenvolver investigação que suporte respostas cientificamente fundamentadas e adequadas às especificidades dos ecossistemas aquáticos açorianos e às imposições legais nacionais e europeias. Por outro lado, este projeto permitirá o aprofundamento do conhecimento já adquirido sobre as lagoas e ribeiras dos Açores e a sua resposta às pressões ambientais a que estão sujeitas, contribuindo para a melhoria da gestão destes ecossistemas.

Para colmatar algumas das principais lacunas detetadas, este projeto pretende:

- Desenvolver novas métricas para a avaliação do estado das massas de água interiores de superfície da Região Hidrográfica dos Açores (Fase 1);
- Desenvolver métodos de quantificação de DNA ambiental para a monitorização das comunidades piscícolas nas lagoas dos Açores (Fase 2);
- Detetar o potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares e implementação de um sistema de alerta para prevenção de riscos para a saúde pública decorrentes da presença de cianotoxinas nas lagoas dos Açores (Fase 3).

Os objetivos atrás expressos foram convertidos em três estudos ou fases do projeto cujos resultados obtidos são apresentados nos capítulos seguintes.

2. Desenvolvimento de novas métricas para a avaliação do estado das massas de água interiores de superfície da Região Hidrográfica dos Açores

2.1. Introdução

Nos últimos anos os elementos biológicos que foram utilizados para a avaliação da qualidade ecológica nos programas de monitorização das massas de água superficiais dos Açores foram os macrófitos, fitoplâncton, fitobentos e invertebrados bentónicos. No entanto, e com base nos conhecimentos actuais, apenas os elementos fitoplâncton, nos sistemas lênticos, e diatomáceas bentónicas, nos sistemas lóticos, estão a ser utilizados de forma consistente para a avaliação do estado ecológico das massas de água superficiais da RH9 (AHA/SRAM 2011). Ambos os componentes são sensíveis às alterações na qualidade dos ecossistemas e, de acordo com os últimos relatórios efectuados no âmbito da monitorização da qualidade ecológica das massas de água, as métricas baseadas em fitobentos e fitoplâncton são mais sensíveis à contaminação orgânica e/ou eutrofização (e.g. Kelly & Whitton 1995; Kelly 1998). No entanto, a maioria das métricas utilizadas para os outros elementos biológicos (e.g. macroinvertebrados) não se adaptam aos programas de monitorização insulares uma vez que foram desenvolvidas para grandes rios continentais e a sua aplicabilidade na RH9 é limitada (Gonçalves et al. 2008; Raposeiro 2011).

Neste sentido, é fundamental desenvolver novas métricas que respondam a outros tipos de pressão ambiental (e.g. alterações hidromorfológicas, introdução de espécies exóticas) e aos gradientes de qualidade que existem na RH9. O conceito de uso das características ecológicas está a crescer na monitorização de sistemas lóticos. As características biológicas, ecológicas e fisiológicas dos elementos biológicos de qualidade definidos pela DQA são relativamente independentes das particularidades dos sistemas lóticos (continentais ou insulares), uma vez que os padrões gerais das comunidades são moldados pelos filtros naturais e antropogénicos, distribuídos em diferentes escalas espaciais (Usseglio-Polatera et al. 2000). Estas características (*traits* ou *guilds* – características que refletem as adaptações das espécies ao meio ambiente) são relativamente diversas e normalmente podem ser divididas em biológicas (e.g. estratégias alimentares e reprodutoras) e ecológicas (e.g. tolerância a diferentes tipos de impacto, tipo de habitat que ocupam). A integração dos fatores abióticos, relacionados

com o tipo de habitat (descritos na sua maioria pelas características biológicas), com os fatores bióticos, que estão intimamente ligados com as estratégias de vida dos organismos (descritos na sua maioria pelas características ecológicas), em métricas baseadas na frequência das categorias destas características, poderá aumentar a sensibilidade e a precisão da identificação e discriminação dos níveis de impactes a que os ecossistemas estão sujeitos (Dolédec et al. 2006). Outra vantagem da aplicação desta metodologia, especialmente em ilhas oceânicas, é que as características utilizadas são transversais a todas as ecorregiões e estão intimamente ligadas aos ecossistemas e aos organismos, podendo ultrapassar as limitações taxonómicas, que estão intimamente ligadas à escala espacial para as quais foram desenvolvidas (Gayraud et al. 2003).

2.2. Metodologia

Este estudo assenta, fundamentalmente, na análise dos dados disponíveis da rede de monitorização de vigilância da RH9. Inicialmente procedeu-se a sistematização de todos os dados obtidos pela rede de vigilância das massas de água interiores de superfície da RH9 entre 2003 e 2012. Para cada uma das categorias de elementos de qualidade (biológica, físico-química e hidromorfológica) foram preparados ficheiros de dados com todos os resultados disponíveis de 2003 a 2012. Para além dos resultados dos parâmetros avaliados no âmbito da rede de monitorização foram calculados outros parâmetros, a partir dos resultados dos parâmetros biológicos, incluindo descritores das comunidades (e.g. índices de diversidade, equitabilidade) e das características ecológicas (*traits* ou *guilds*) das espécies presentes (e.g. predadores, fragmentadores, perfil alto, perfil baixo, fixos, móveis) que permitiram obter outros indicadores do estado das massas de água. Estes indicadores permitirão avaliara não só o estado estrutural das comunidades biológicas aquáticas, como também o seu estado funcional.

Após a sistematização dos resultados da rede de vigilância das massas de água interiores de superfície da RH9 entre 2003 e 2012 obteve-se uma base de dados que composta por várias centenas de amostras e um elevado número de variáveis, entre variáveis hidromorfológicas, físico-químicas e biológicas. Nas tabelas Tabela 1 e Tabela 2 apresenta-se um resumo dos dados incluídos na referida base de dados para as categorias de massas de água Lagoas e Ribeiras, respetivamente.

Tabela 1. Resumo dos dados disponíveis na base de dados relativos à categoria de massas de água Lagoas.

Tipo de pântano	Número de variáveis	Número de amostras	Número de amostras com todos os parâmetros
Hidromorfológico	8	903	681
Físico-químico	35	903	
Biológico	13	681	

Tabela 2. Resumo dos dados disponíveis na base de dados relativos à categoria de massas de água Ribeiras.

Tipo de pântano	Número de variáveis	Número de amostras	Número de amostras com todos os parâmetros
Hidromorfológico	8	319	319
Físico-químico	19	319	
Biológico	7	319	

Por razões de disponibilidade de tempo para harmonização dos dados, foram selecionados dados da comunidade de macroinvertebrados de 24 pontos pertencentes a 8 ribeiras e 2 afluentes de lagoas (Furnas e Fogo) na ilha de São Miguel (Tabela 3), entre os anos de 2009 e 2012. Estes dados foram utilizados para testar a viabilidade do uso de diferentes métricas para a avaliação da qualidade ecológica das massas de água da categoria ribeiras nos Açores.

Antes de analisar a distribuição dos macroinvertebrados e sua relação com as características ambientais testou-se a homogeneidade dos dados usando a função *betadisper* do pacote *Vegan* (Oksanen et al., 2016). Uma vez que foi confirmada a homogeneidade dos dados ($F = 1,25$; $p = 0,25$), realizaram-se testes PERMANOVA para comparar as comunidades de macroinvertebrados entre os locais, estações e anos. Para a determinação das espécies indicadoras dos diferentes locais e estações do ano utilizou-se a função *multipatt* do pacote *Indicspecies*. A análise da relação entre a distribuição de macroinvertebrados e as características abióticas dos locais analisados foi efetuada através de RDA. Para o estudo integrado das componentes biótica (abundância de macroinvertebrados), abiótica e grupos funcionais de macroinvertebrados utilizou-se a análise RLQ.

Foram testados diferentes índices, nomeadamente o índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Simpson, índice de diversidade invertido de Simpson, equitabilidade de Pielou, riqueza de espécies de Margalef, riqueza de espécies α de

Fisher, índice de espécies não vistas de Chao, ACE (Coverage-based estimator) e entropia de Rényi (11 níveis de α : 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e Inf).

O pacote *Vegan* (Oksanen et al., 2016) para o software R foi usado para o cálculo de todos os índices de diversidade investigados. Já o cálculo dos EQRs (Ecological Quality Ratio) foi obtido através do pacote BEQI2 (van Loon & Walvoort, 2015) no software R.

Os valores de referência máximo e mínimo utilizados no cálculo dos EQRs foram os máximos e mínimos dentro dos valores observados dentro da Ilha de São Miguel, uma vez que há uma grande discrepância na composição faunística desta Ilha com as demais regiões da Europa continental.

Tabela 3. Ribeiras e afluentes na ilha de São Miguel, e respectivos códigos, utilizados nas análises, tabelas e gráficos apresentados neste capítulo.

Ribeira ou afluente	Código
Afluente 1 da lagoa das Furnas	FA1
Afluente 2 da lagoa das Furnas	FA2
Afluente 3 da lagoa das Furnas	FA3
Afluente 1 da lagoa do Fogo	FGA1
Afluente 2 da lagoa do Fogo	FGA2
Ribeira dos Caldeirões	RC2C
Ribeira do Faial da Terra - Montante	RFT0
Ribeira do Faial da Terra - Meio	RFT1
Ribeira do Faial da Terra - Jusante	RFT2
Ribeira Grande - Montante	RG0
Ribeira Grande - Montante	RG1B
Ribeira Grande - Meio	RG2
Ribeira Grande - Jusante	RG3
Ribeira do Guilherme - Montante	RGU0
Ribeira do Guilherme - Meio	RGU1
Ribeira do Guilherme - Jusante	RGU2
Ribeira da Praia - Meio	RP0
Ribeira da Praia - Meio	RP1
Ribeira da Povoação - Jusante	RPV4
Ribeira Quente - Meio	RQ2
Ribeira Quente - Meio	RQ3
Ribeira Quente - Jusante	RQ4
Ribeira Teixeira - Meio	RTX
Ribeira Teixeira - Meio	RTX2

Com base na análise dos resultados foi necessário criar de um novo índice, tendo sido desenvolvido o índice entitulado Rényi EQR score ⁽¹⁾:

$$^{(1)} \text{REQRscore} = (\text{Excelente}\% \cdot 0.9) + (\text{Bom}\% \cdot 0.7) + (\text{Razoável}\% \cdot 0.5) + (\text{Medíocre}\% \cdot 0.3) + (\text{Mau}\% \cdot 0.1)$$

Onde o percentual geral de classificação em cada um dos 5 níveis de EQR obtido nos 11 níveis da entropia de Rényi foi utilizado como fator de ponderação da contribuição do EQR para o Rényi EQR score multiplicado pelo valor médio do respectivo EQR (Excelente = 0,9; Bom = 0,7; Razoável = 0,5; Medíocre = 0,3 e Mau = 0,1). O Rényi EQR score varia, portanto, entre 10 e 90. Posteriormente, este valor foi usado para a classificação das ribeiras, onde pontuações de 10 a 26 indicam o nível Mau, de 26 a 42 o nível Medíocre, de 42 a 58 o nível Razoável, de 58 a 74 o nível Bom e de 74 a 90 o nível Excelente. As espécies indicadoras do índice Rényi EQR score foram identificadas através do pacote indicspec do software R (De Cáceres & Legendre, 2009).

2.3. Resultados

Confirmada a homogeneidade dos dados (Figura 1), a análise tree-way ANOVA mostrou que não há diferenças significativas nas comunidades de macroinvertebrados entre os anos analisados, mas que existe uma interação significativa entre as os locais e a estação (Tabela 4).

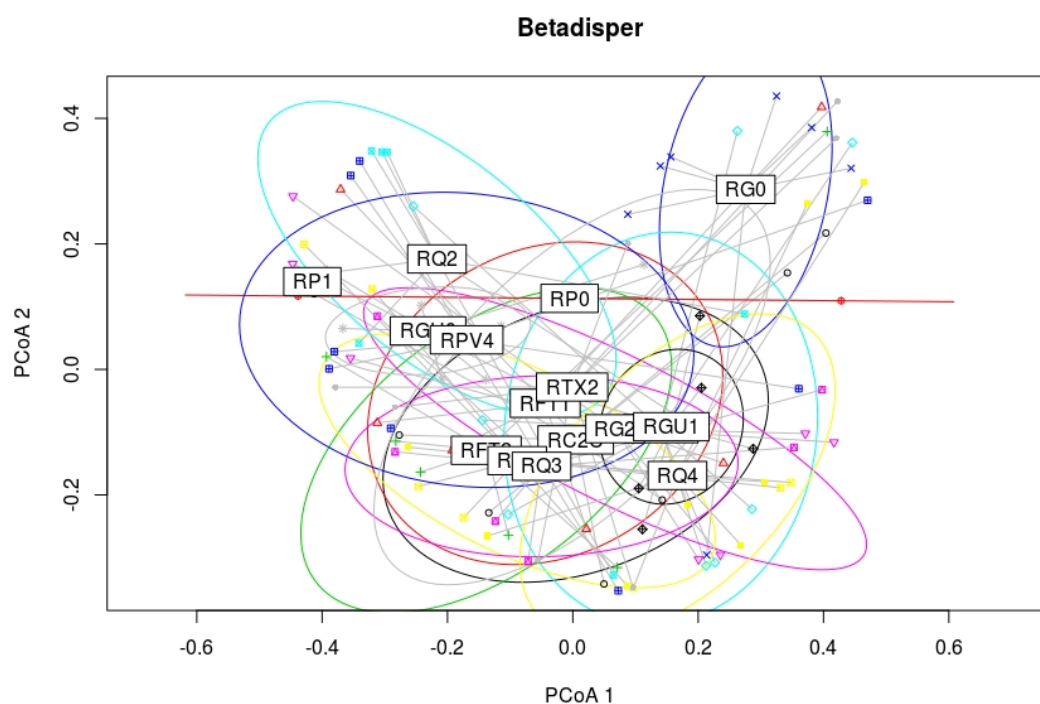


Figura 1. Gráfico de ordenação bidimensional PCoA mostrando a homogeneidade dos dados de macroinvertebrados nas ribeiras selecionadas para análise.

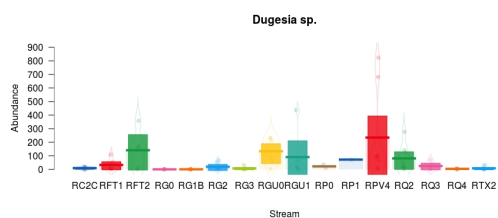
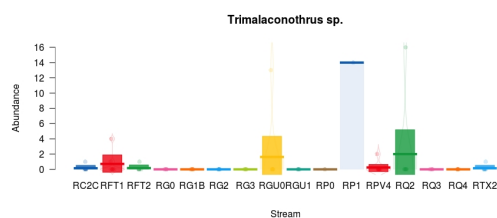
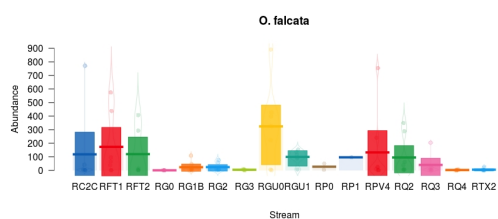
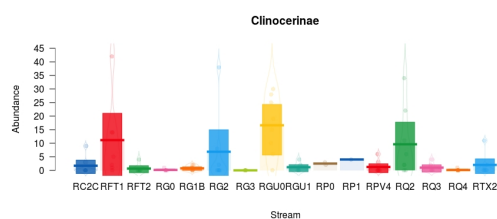
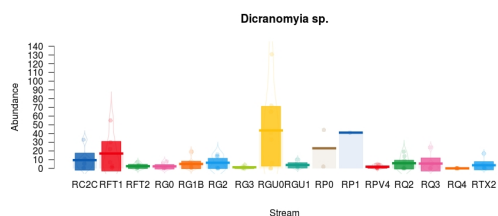
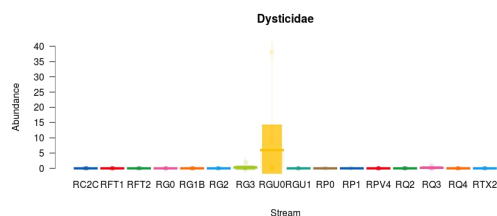
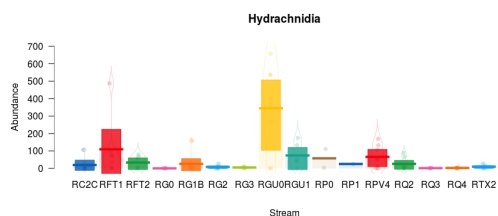
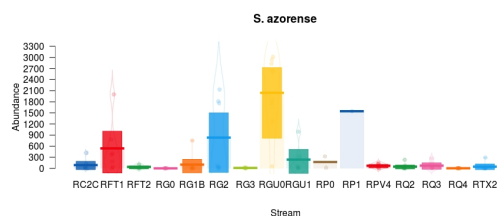
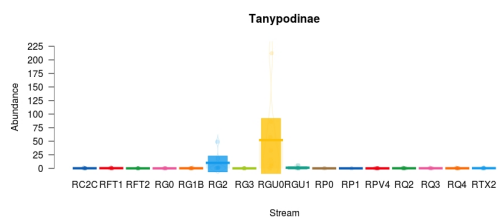
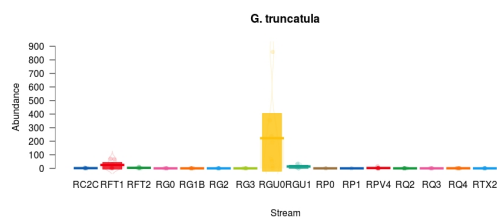
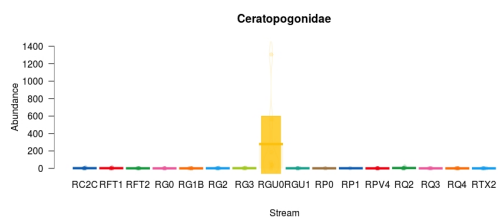
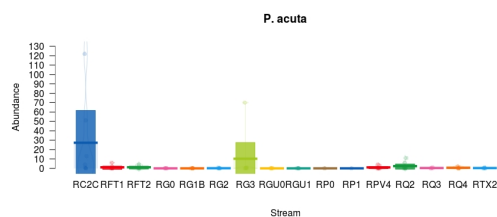
Tabela 4. Resultados da análise tree-way PERMANOVA das comunidades de macroinvertebrados das ribeiras selecionadas para análise.

	Df	Sum of squares	Mean of squares	F model	r ²	p
Ribeiras	15	9.05	0.60	2.97	0.28	< 0.001***
Estações	2	4.14	2.07	10.20	0.13	< 0.001***
Anos	3	1.16	0.39	1.21	0.04	0.20
Ribeiras x Estações	24	7.19	0.30	1.47	0.22	< 0.001***
Ribeiras x Anos	37	7.52	0.20	0.64	0.23	1.00
Estações x Anos	2	0.73	0.37	1.29	0.02	0.18
Ribeiras x Estações x Anos	21	4.19	0	0	0.13	1.00

Através da função *multipatt* foi possível identificar as espécies indicadoras das diferenças entre os locais (Figura 2) e entre estações (Em relação às estações, a análise identificou uma espécie indicadora do verão (*Limoniini*, stat = 0.40, p < 0.05) e 14 espécies indicadoras da primavera (*Orthoclaadiinae*, stat = 0.94, p < 0.001; *Naididae*, stat = 0.92, p < 0.001; *Hydroptila* sp., stat = 0.91, p < 0.001; *Drycanomia* sp., stat = 0.89, p < 0.001; *S. azorense*, stat = 0.83, p < 0.01; *Tipula* sp., stat = 0.78, p < 0.001; *Psychodidae*, stat = 0.75, p < 0.001; *Clinocerinae*, stat = 0.70, p < 0.001; *Lumbriculidae*, stat = 0.69, p < 0.001; *Chironomini*, stat = 0.59, p < 0.01; *Dryops* sp., stat = 0.57, p < 0.05; *Tanytarsini*, stat = 0.54, p < 0.05; *S. brevirostris*, stat = 0.47, p < 0.05; *Hydrozetes* sp., stat = 0.44, p < 0.05).

Figura 3).

Relativamente aos locais, a análise identificou 15 espécies indicadoras de 5 locais: RC2C (*P. acuta*, stat = 0.66, p < 0.01), RGU0 (*Ceratopogonidae*, stat = 0.92, p < 0.001; *G. truncatula*, stat = 0.86, p < 0.001; *Tanypodinae*, stat = 0.85, p < 0.001, *S. azorense*, stat = 0.71, p < 0.001; *Hydrachnidia*, stat = 0.61, p < 0.001; *Dysticidae*, stat = 0.59, p < 0.05; *Drycanomia* sp., stat = 0.54, p < 0.01; *Clinocerinae*, stat = 0.54, p < 0.01; *O. falcata*, stat = 0.51, p < 0.05), RP1 (*Trimalaconothrus* sp., stat = 0.51, p < 0.05), RPV4 (*Dugesia* sp., stat = 0.57, p < 0.01) and RQ2 (*Naididae*, stat = 0.64, p < 0.001; *Ostracoda*, stat = 0.58, p < 0.05; *Orthoclaadiinae*, stat = 0.47, p < 0.05).



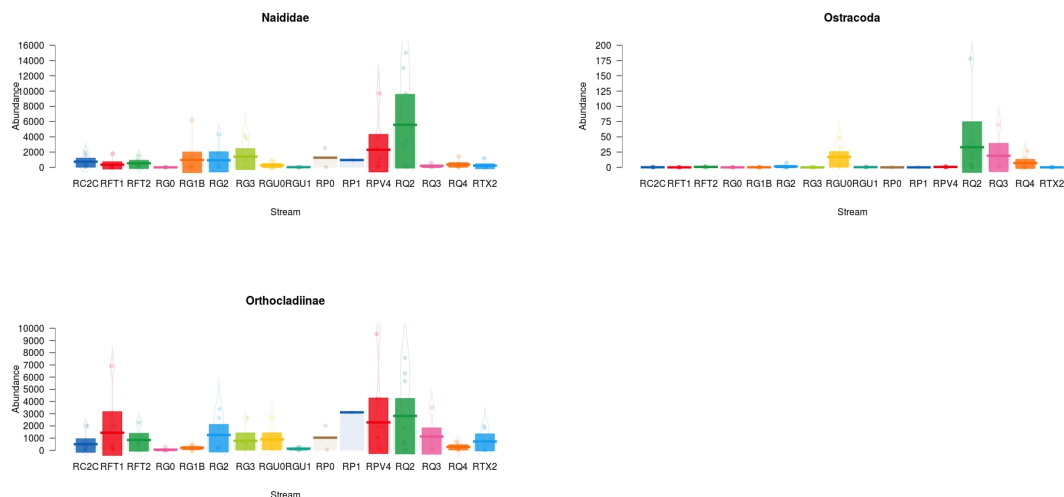
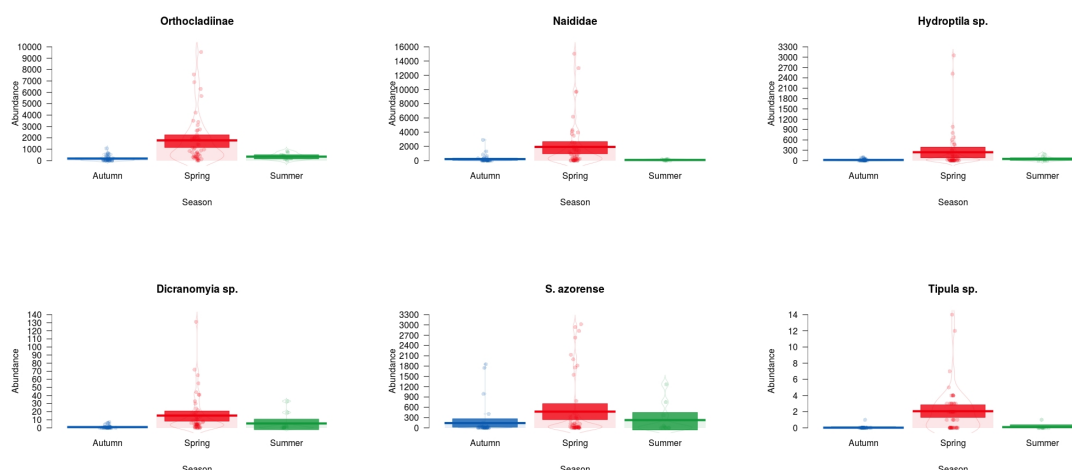


Figura 2. Distribuição das espécies de macroinvertebrados indicadoras do local nas ribeiras selecionadas para análise.

Em relação às estações, a análise identificou uma espécie indicadora do verão (Limoniini, $\text{stat} = 0.40$, $p < 0.05$) e 14 espécies indicadoras da primavera (Orthocladinae, $\text{stat} = 0.94$, $p < 0.001$; Naididae, $\text{stat} = 0.92$, $p < 0.001$; *Hydroptila* sp., $\text{stat} = 0.91$, $p < 0.001$; *Drycanomia* sp., $\text{stat} = 0.89$, $p < 0.001$; *S. azorensis*, $\text{stat} = 0.83$, $p < 0.01$; *Tipula* sp., $\text{stat} = 0.78$, $p < 0.001$; Psychodidae, $\text{stat} = 0.75$, $p < 0.001$; Clinocerinae, $\text{stat} = 0.70$, $p < 0.001$; Lumbriculidae, $\text{stat} = 0.69$, $p < 0.001$; Chironomini, $\text{stat} = 0.59$, $p < 0.01$; *Dryops* sp., $\text{stat} = 0.57$, $p < 0.05$; Tanytarsini, $\text{stat} = 0.54$, $p < 0.05$; *S. brevirostris*, $\text{stat} = 0.47$, $p < 0.05$; *Hydrozetes* sp., $\text{stat} = 0.44$, $p < 0.05$).



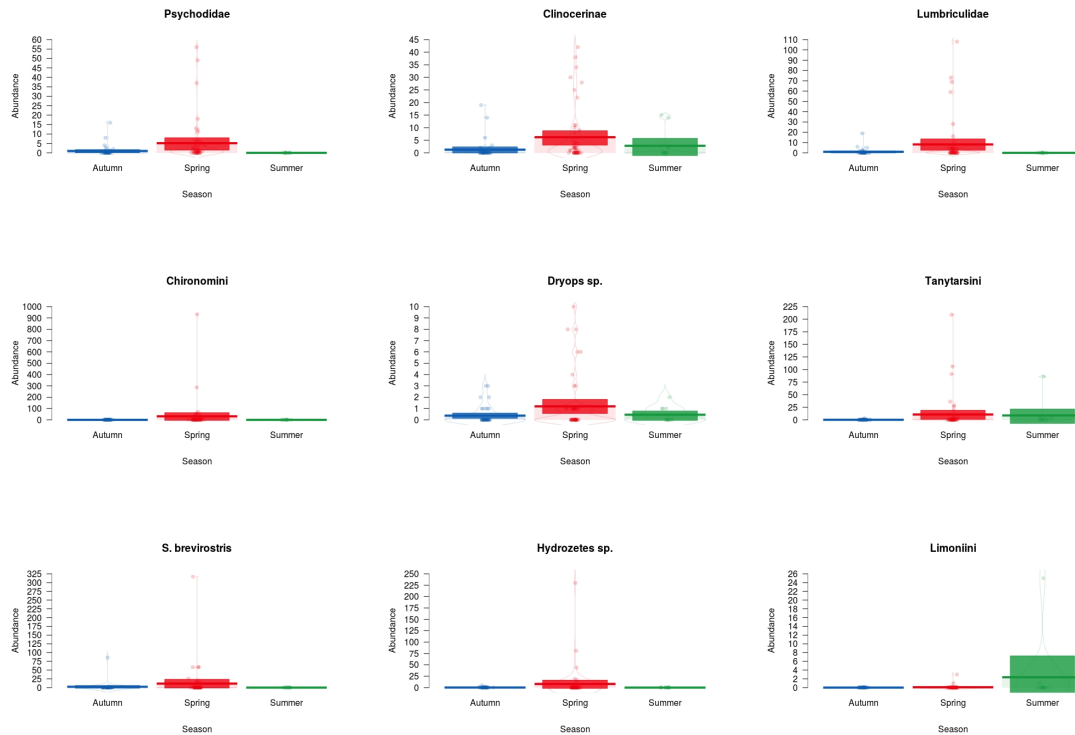


Figura 3. Distribuição das espécies de macroinvertebrados indicadores da estação nas ribeiras selecionadas para análise.

As características abióticas das ribeiras explicam aproximadamente 30% da composição e abundância dos macroinvertebrados nas ribeiras (Figura 4).

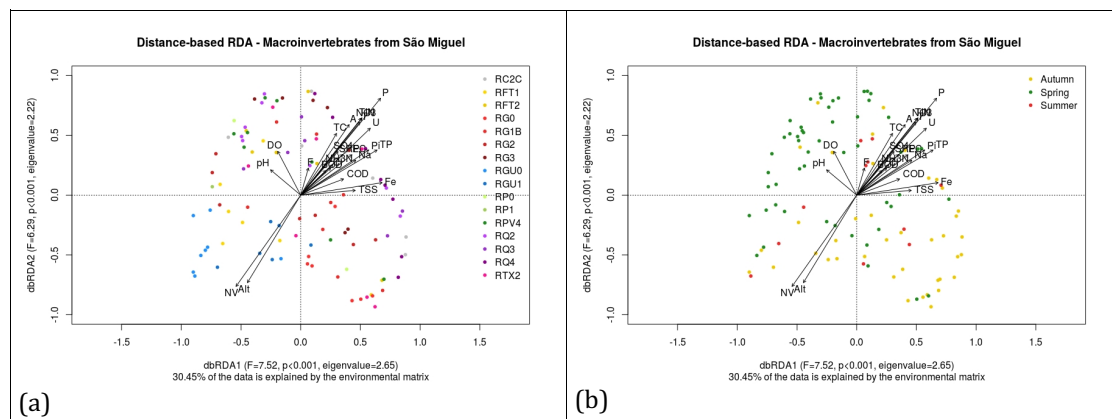


Figura 4. Resultados da análise RDA para as comunidades de macroinvertebrados com base em 24 variáveis abióticas em 16 locais (a) e 3 estações (b).

Considerando a importância das características abióticas na distribuição das espécies e *traits* de macroinvertebrados nas ribeiras procedeu-se a uma análise RLQ para perceber o carácter determinante de cada uma delas e da sua combinação nessa distribuição. Na análise RLQ utilizou-se 24 variáveis na tabela R (variáveis ambientais), 102 variáveis na

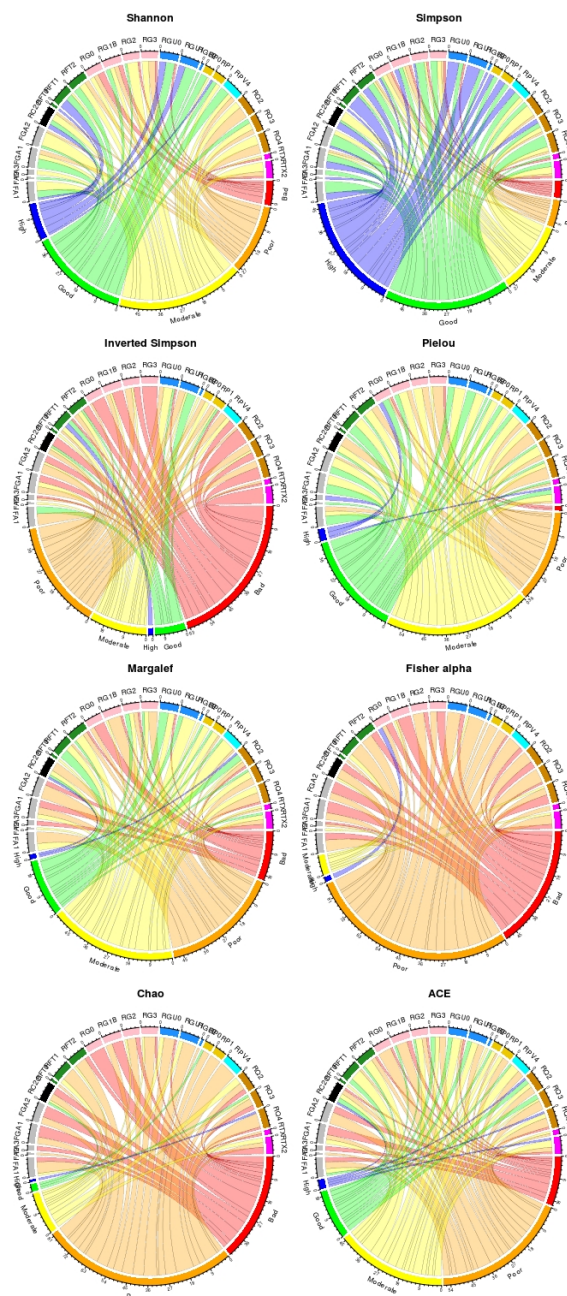


Figura 7. Classificação de afluentes e ribeiras de São Miguel nos níveis EQR (Ecological Quality Ratio) de acordo com 8 diferentes índices. Arcos azuis = Excelente, Arcos verdes = Bom, Arcos amarelos = Razoável, Arcos laranja = Medíocre, Arcos vermelhos = Mau.

Valores mais baixos de α geraram mais classificações nos níveis Excelente e Bom, ao passo que o Rényi score apresentou uma classificação mais homogênea entre os 5 níveis de EQR (Figura 8).

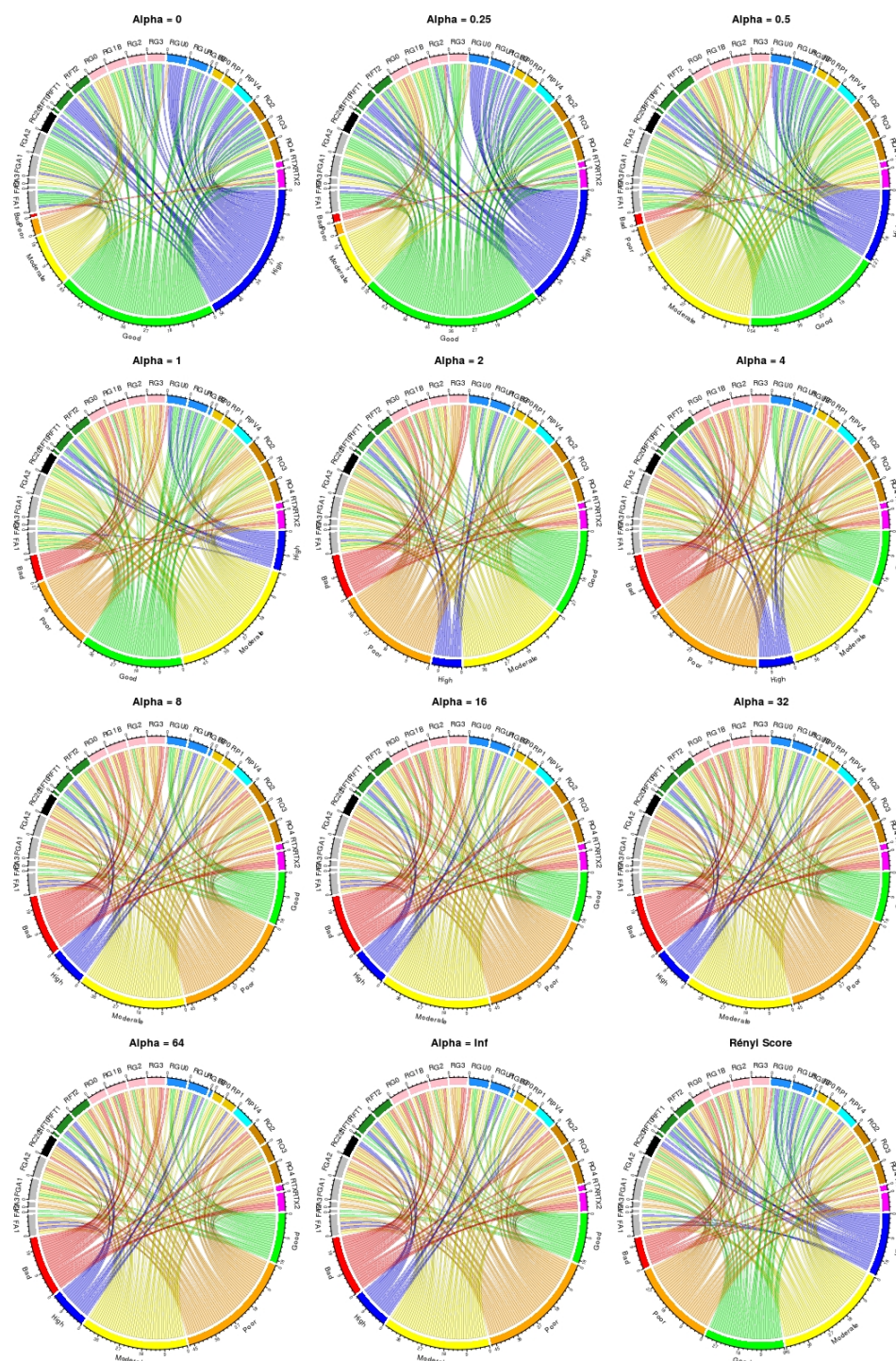


Figura 8. Classificação de afluentes e ribeiras de São Miguel nos níveis EQR (Ecological Quality Ratio) de acordo com 11 níveis da entropia de Rényi e o Rényi Score. Arcos verdes = Bom, Arcos amarelos = Razoável, Arcos laranja = Mediocre, Arcos vermelhos = Mau.

Em geral, a maioria dos índices apresentou uma classificação desviada para um dos extremos de EQR, sendo a diversidade de Shannon, Rényi ($\alpha = 1$) e principalmente Rényi score as que apresentaram classificações mais uniformes entre os diferentes níveis EQR (Tabela 6).

Tabela 6. Classificação percentual dentro dos níveis de EQR (Ecological Quality Ratio) das ribeiras e afluentes de lagoas de São Miguel para cada um dos índices investigados.

Índice	Excelente (%)	Bom (%)	Razoável (%)	Medíocre (%)	Mau (%)
Shannon	10.20	27.89	36.05	19.05	6.80
Simpson	31.97	36.05	19.73	7.48	4.76
Simpson invertido	1.36	8.84	16.33	29.93	43.54
Pielou	3.40	28.57	34.01	25.85	8.16
Margalef	1.36	15.65	36.05	33.33	13.61
Fisher α	1.36	0.00	5.44	59.18	34.01
Chao	0.68	2.04	11.56	55.78	29.93
ACE	2.72	13.61	31.29	38.78	13.61
Rényi ($\alpha = 0$)	38.10	43.54	13.61	4.08	0.68
Rényi ($\alpha = 0.25$)	31.29	49.66	14.29	2.72	2.04
Rényi ($\alpha = 0.5$)	19.05	37.41	34.01	6.80	2.72
Rényi ($\alpha = 1$)	10.20	27.89	36.05	19.05	6.80
Rényi ($\alpha = 2$)	8.16	22.45	29.93	27.89	11.56
Rényi ($\alpha = 4$)	9.52	14.29	29.93	31.29	14.97
Rényi ($\alpha = 8$)	9.52	13.61	29.25	31.97	15.65
Rényi ($\alpha = 16$)	9.52	12.93	29.93	31.97	15.65
Rényi ($\alpha = 32$)	10.20	12.93	29.25	31.97	15.65
Rényi ($\alpha = 64$)	10.20	12.93	29.25	31.97	15.65
Rényi ($\alpha = \text{Inf}$)	10.20	12.93	29.25	31.97	15.65
Rényi score	16.33	21.77	30.61	23.13	8.16

Numa análise global da entropia de Rényi verifica-se que 15,2% das amostras analisadas foram classificadas como pertencentes ao EQR Excelente, 23,7% com EQR Bom, 27,7% no nível Razoável, 22,9% no Medíocre e 10,6% no nível Mau do rácio de qualidade ecológica de todos os scores da entropia de Rényi (Figura 9). É possível verificar que nos níveis mais baixos da entropia de Rényi é maior a percentagem de classificações nos estados de melhor qualidade ao contrário do que se verifica nos níveis mais elevados.

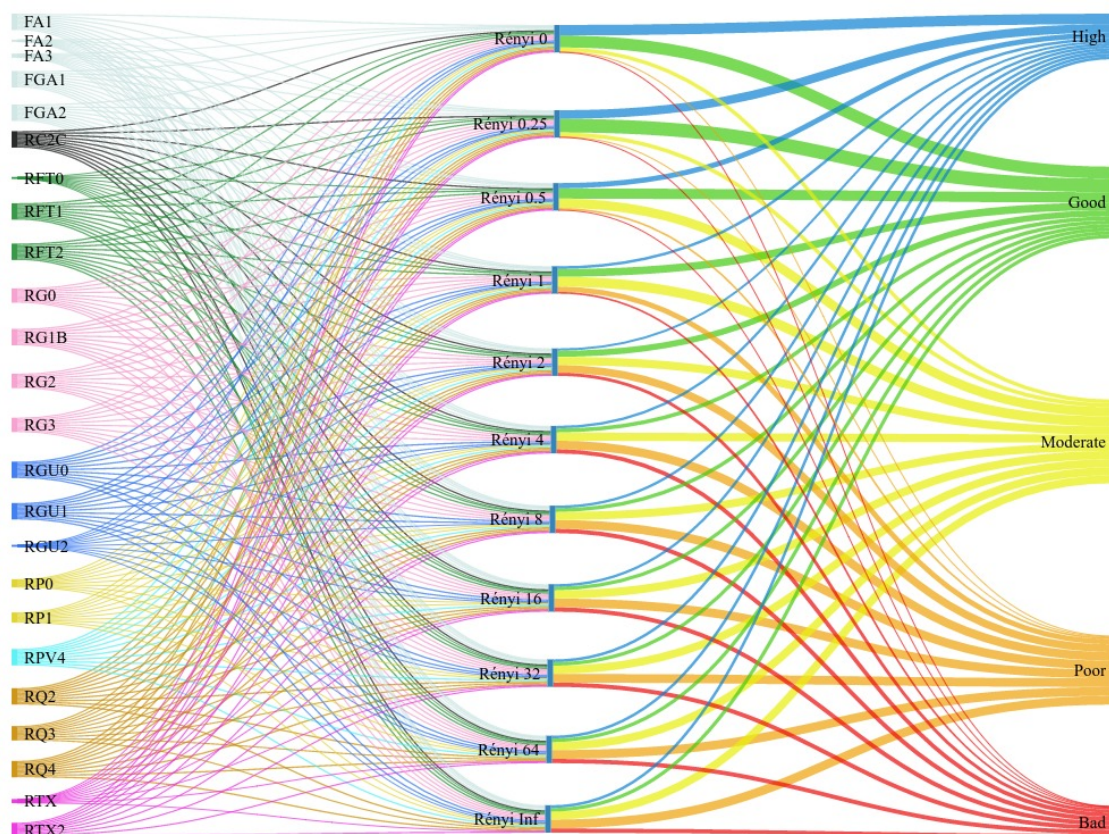


Figura 9. Diagrama Sankey ligando as ribeiras analisadas através de todos os níveis da entropia de Rényi utilizados para a classificação do estado das ribeiras com base no rácio de qualidade ecológica das respetivas comunidades de macroinvertebrados.

Uma vez que o índice Rényi score foi aquele que apresentou melhor distribuição entre os níveis EQR e maior robustez matemática e ecológica, foi então utilizado para a classificação dos afluentes e ribeiras de São Miguel de acordo com o valor médio do score por local amostrado. Destacam-se os locais RFT0 e RFT1 (Ribeira do Faial da Terra) como os únicos que foram classificados no nível Excelente. Em contrapartida, os locais RG0 e RG3 (Ribeira Grande), e RTX e RTX2 (Ribeira Teixeira) foram aquelas que apresentaram as piores classificações dentre todos os locais analisados (Figura 10).

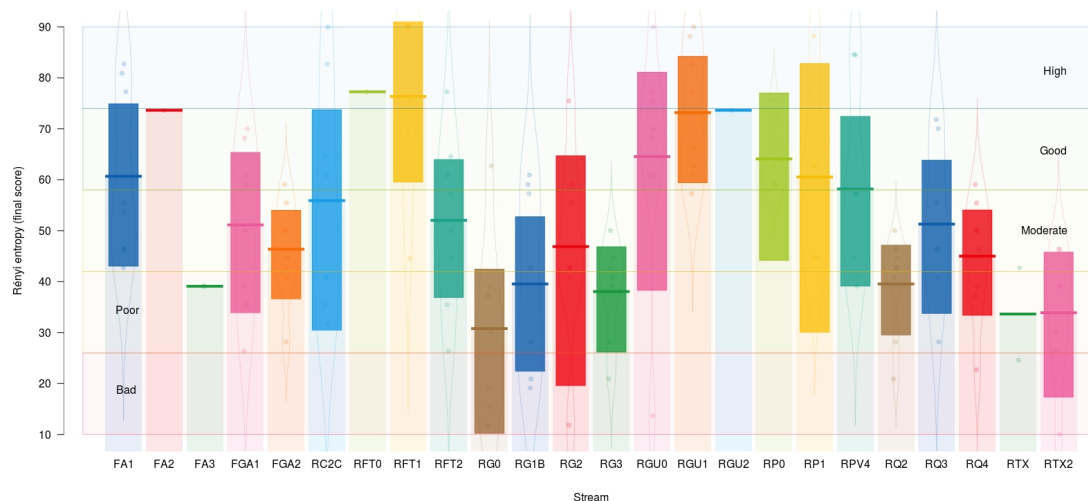
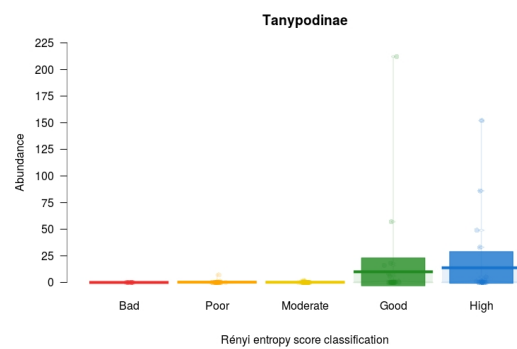
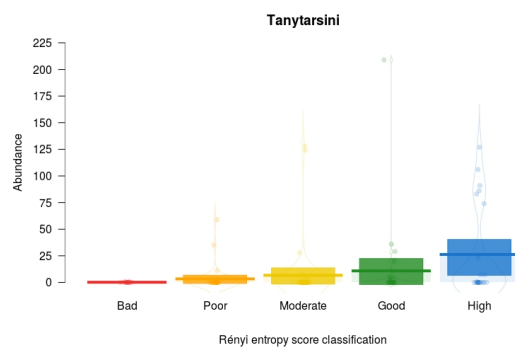
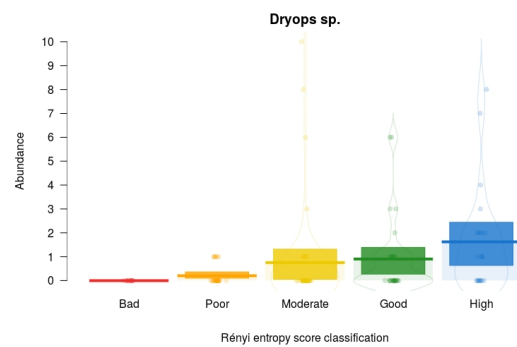
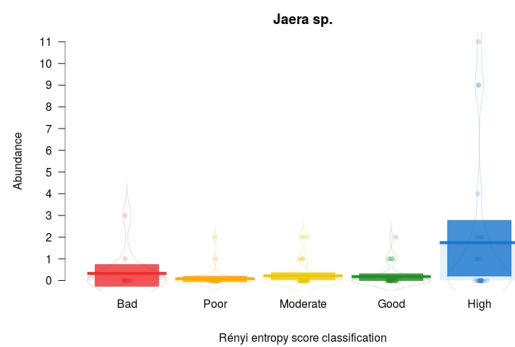
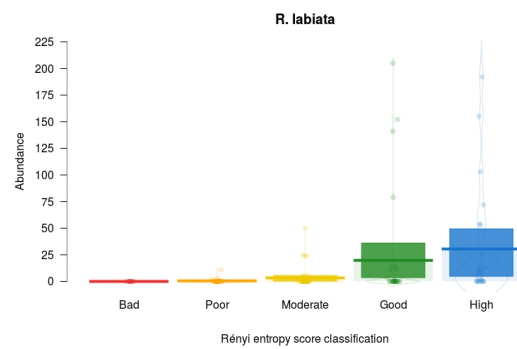
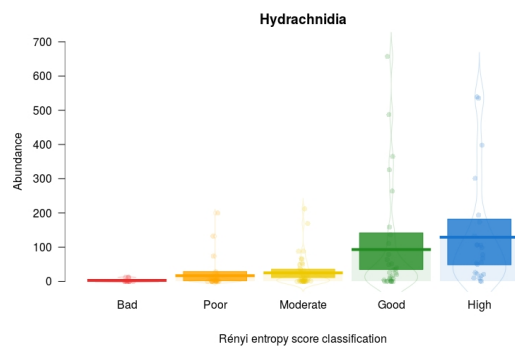
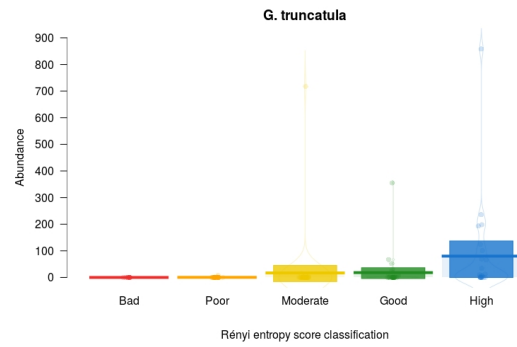
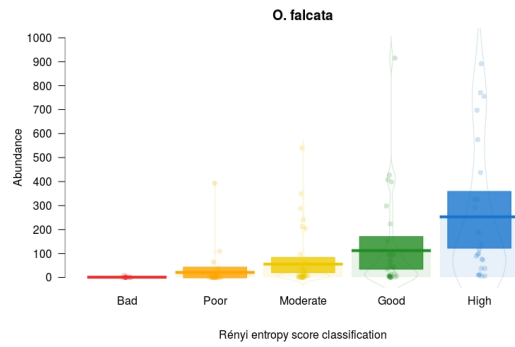
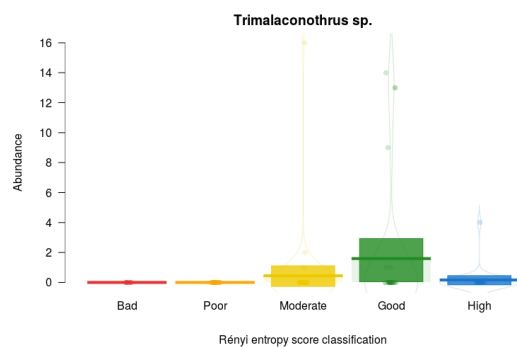
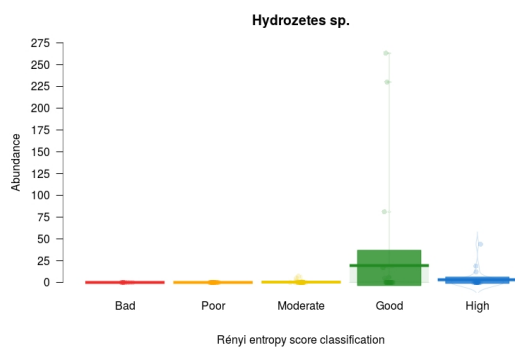
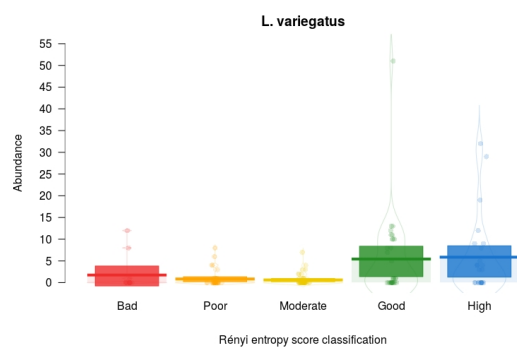
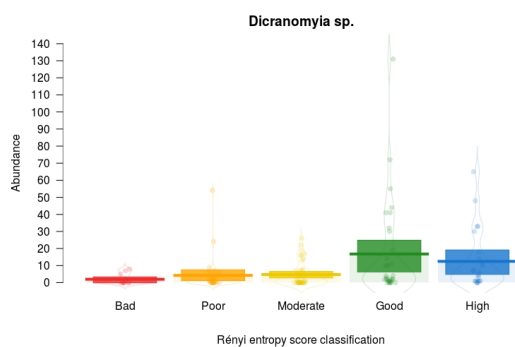
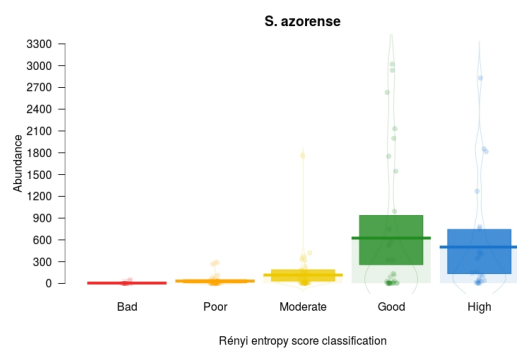
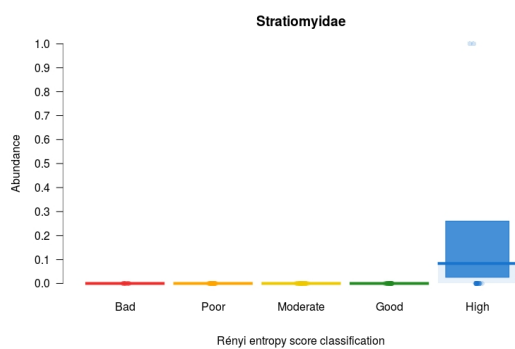
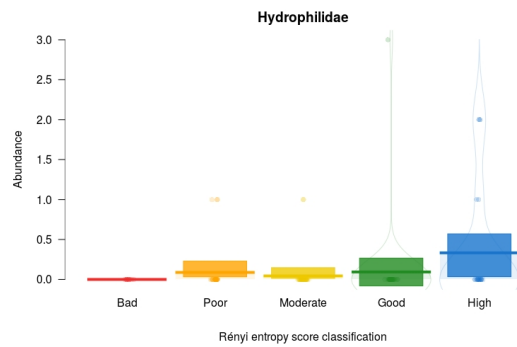
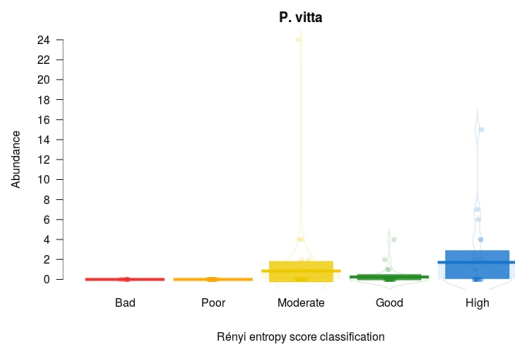


Figura 10. Classificação em níveis de EQR (Ecological Quality Ratio) do índice Rényi score em cada um dos locais analisados (Ribeiras e afluentes de lagoas de São Miguel). Pontos indicam os dados brutos, barras indicam as tendências centrais, as curvas referem-se à densidade suavizada, enquanto os retângulos horizontais indicam os intervalos de referência (Intervalo de maior densidade Bayesianos).

A análise multipatt indicou 19 espécies como descritoras de 3 níveis de EQR baseando-se na classificação do Rényi score. O nível Excelente é caracterizado por *Oxyethira faltaca* (stat = 0.69, $p < 0.001$), *Galba truncatula* (stat = 0.63, $p < 0.001$), Hydrachnidia (stat = 0.62, $p < 0.05$), *Radix labiata* (stat = 0.56, $p < 0.001$), *Jaera* sp. (stat = 0.52, $p < 0.001$), *Dryops* sp. (stat = 0.47, $p < 0.05$), Tanytarsini (stat = 0.46, $p < 0.05$), Tanypodinae (stat = 0.45, $p < 0.05$), *Phagocata vitta* (stat = 0.40, $p < 0.05$), Hydrophilidae (stat = 0.32, $p < 0.05$) e Stratiomyidae (stat = 0.29, $p < 0.05$). Por outro lado os taxa *Simulium azorense* (stat = 0.68, $p < 0.05$), *Dicranomyia* sp. (stat = 0.60, $p < 0.05$), *Lumbriculus variegatus* (stat = 0.50, $p < 0.05$), *Hydrozetes* sp. (stat = 0.47, $p < 0.01$) e *Trimalaconothrus* sp. (stat = 0.36, $p < 0.05$) são indicadores do nível Bom. O nível Razoável é caracterizado por Naididae (stat = 0.70, $p < 0.05$), Orthoclaadiinae (stat = 0.64, $p < 0.05$) e Poduridae (stat = 0.36, $p < 0.05$) (Figura 11).





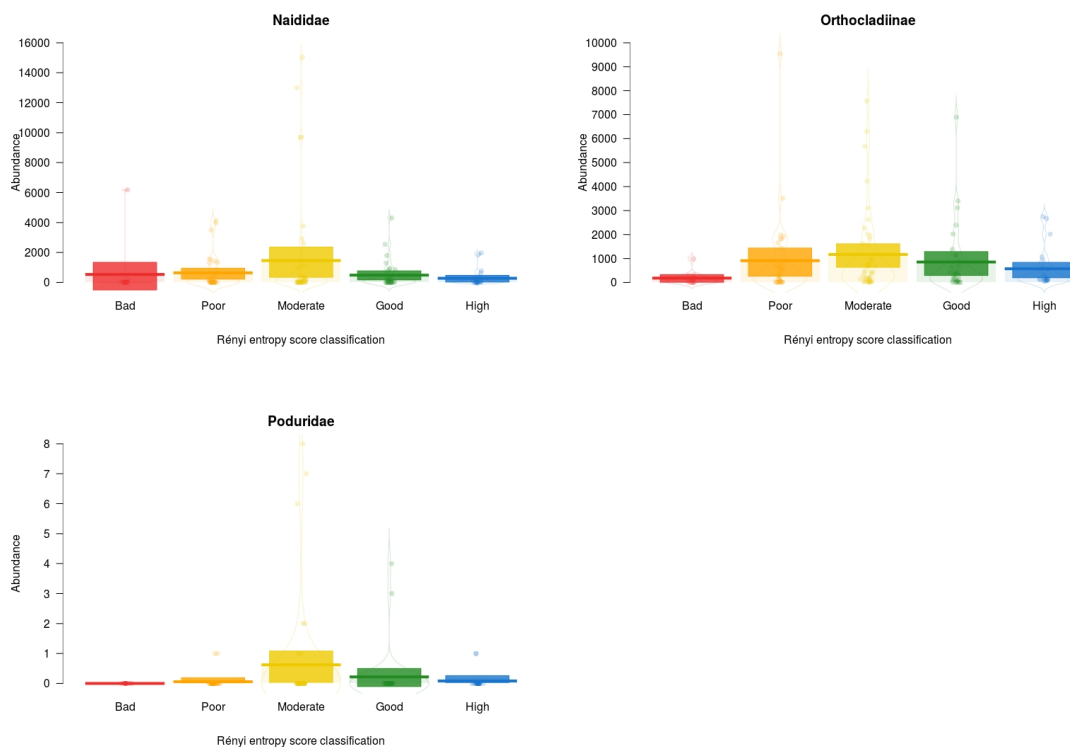


Figura 11. Abundância das espécies de macroinvertebrados identificadas como indicadores dos níveis de EQR determinados pelo Rényi score (análise multipatt no indicspec package do cran-R).

2.4. Discussão

O índice desenvolvido mostrou-se capaz de classificar o estado ecológico das ribeiras e dos afluentes de lagoas de São Miguel de maneira eficiente. Ao adotar um score multimétrico é possível minimizar os desvios de classificação de cada índice isolado, que via de regra acabam por dar maior peso à riqueza específica de espécies ou à distribuição igualitária das espécies numa comunidade. A Entropia de Rényi mostra-se eficiente na avaliação mais holística de comunidades de macroinvertebrados, entretanto, a falta de um valor único, dificultava a sua utilização em índices de qualidade ecológica. Acreditamos que o índice apresentado neste relatório pode colmatar esta falha, possibilitando que as massas de água da categoria ribeiras nos Açores possam ser classificadas em EQRs que sejam mais adequados à realidade local, caracterizada por uma diversidade relativamente baixa, com marcada dominância de espécies distintas em áreas diferentes.

Futuramente, este índice será testado em massas de água da mesma categoria noutras ilhas do arquipélago de modo a homogeneizar a classificação em EQRs na Região.

O desenvolvimento de modelos matemáticos com a inclusão das espécies bioindicadoras identificadas neste estudo, poderá ser um caminho natural para o aperfeiçoamento das ferramentas de detecção e classificação das massas de água da Região.

2.5. Proposta de metodologia para a avaliação do estado ecológico das massas de água interiores de superfície da Região Hidrográfica dos Açores

Embora Diretiva Quadro da Água e a Lei da Água indiquem os elementos de qualidade que devem ser usados para a avaliação do estado ecológico das massas de água, não definem em concreto os critérios a adotar por cada estado membro nessa avaliação. Em Portugal, de acordo com o disposto no número 5 do artigo 46.º da Lei da Água, os critérios para a classificação do Estado Ecológico das águas de superfície devem ser definidos em normas a aprovar. Para o cumprimento desta determinação legal, o Instituto da Água (INAG), em conformidade com os requisitos da DQA, integrou a 1ª fase do Exercício de Intercalibração comunitário tendo daí resultado os “Critérios Para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais – Rios e Albufeiras” (INAG, 2009). Nesse documento é proposto o sistema de classificação do Estado das massas de água com base no seu Estado Ecológico e Estado Químico e são apresentados os critérios para a classificação do Estado das massas de água da categoria Rios e diretrizes para a classificação do Estado de massas de água fortemente modificadas – albufeiras.

A Região Hidrográfica dos Açores não integrou o Exercício de Intercalibração e não foram definidos formalmente os critérios para a classificação do Estado das suas massas de água. Para além disso, não podem ser adotados os critérios do INAG (2009) por estes não incluírem os tipos de massas de água de superfície existentes na Região Hidrográfica dos Açores. Entretanto, no âmbito da elaboração do Plano de Gestão da Região Hidrográfica dos Açores (PGRH 2011, 2015) foram propostas metodologias para a classificação das massas de água interiores de superfície dos Açores com base em estudos científicos (Gonçalves et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Gonçalves, 2008). Apesar de não poderem ser aplicados os critérios de avaliação definidos pelo INAG às lagoas e ribeiras dos Açores, nomeadamente os que dizem respeito aos elementos biológicos utilizados na avaliação do estado ecológico e aos valores de fronteira entre as classes de estado para cada um desses elementos, adoptar-se-á o sistema global de classificação aí proposto, que está em conformidade com o Anexo V da DQA e as orientações dos grupos de trabalho de implementação dessa diretiva (WFD-CIS, 2003a; 2003b; 2005).

De acordo com INAG (2009), o estado de uma massa de água de superfície é definido em função dos seus estados Ecológico e Químico, considerando-se, de acordo com o princípio do *one out – all out*, o pior dos dois estados (Figura 12). Portanto, para alcançar o objetivo do Bom Estado a DQA requer que as massas de água de superfície atinjam pelo menos o Bom Estado Ecológico e o Bom Estado Químico.

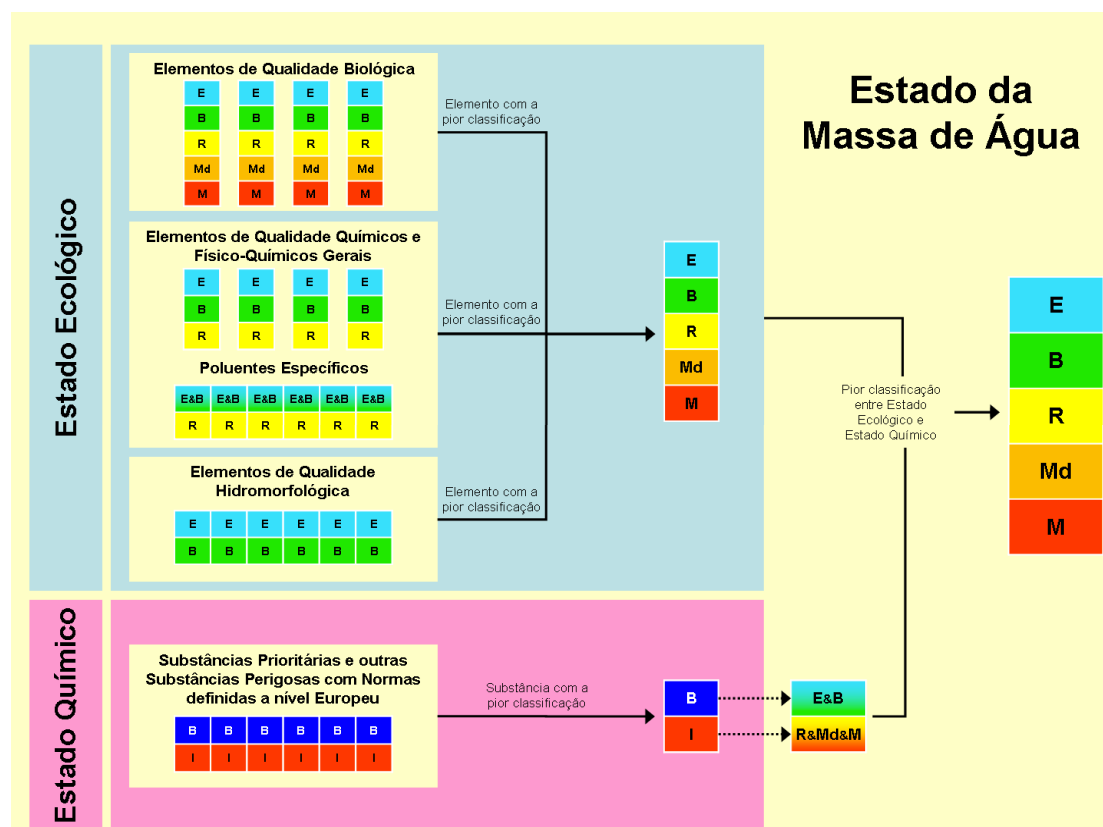


Figura 12. Esquema conceptual do sistema de classificação no âmbito da Diretiva-Quadro da Água/Lei da Água (INAG, 2009). Estado Ecológico e Estado da Massa de Água: E- Excelente; B- Bom; R- Razoável; Md- Medíocre; M- Mau. Estado Químico: B- Bom; I- Insuficiente.

O Estado Ecológico é a expressão da qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos associados às águas de superfície. A sua classificação é feita com base no desvio relativamente às condições das massas de água do mesmo tipo, em condições consideradas de referência. O Estado Ecológico de referência é, dentro de cada tipo de massa de água, o estado que corresponde à ausência de pressões antropogénicas significativas e sem que se façam sentir os efeitos da industrialização, urbanização ou intensificação da agricultura, podendo ocorrer apenas pequenas alterações nas condições físico-químicas, hidromorfológicas e biológicas.

No âmbito da DQA, a avaliação do estado ecológico é efetuada no sentido da preservação da integridade dos ecossistemas e das suas comunidades biológicas. Para tal, devem ser utilizados elementos indicadores da qualidade biológica dos ecossistemas e elementos de qualidade ambiental necessários ao suporte adequado das comunidades biológicas.

Considerando que no presente estudo apenas foram analisados os elementos biológicos de qualidade, a proposta de avaliação do estado ecológico abaixo apresentada refere-se apenas este elemento de qualidade devendo manter-se a classificação com base nos elementos físico-químicos e hidromorfológicos conforme proposto no PGRH Açores (PGRH 2015). Do mesmo modo, tendo em conta que a análise agora efetuada recaiu sobre o elemento biológico macroinvertebrados da categoria de massas de água Rios, a proposta aqui apresentada aplica-se somente a esta categoria da massas de água devendo manter-se a avaliação do estado ecológico das lagoas conforme previsto no referido PGRH.

No PGRH Açores (PGRH 2011) foi proposta uma avaliação do estado ecológico das ribeiras com base em elementos biológicos utilizando unicamente as diatomáceas bentónicas e em concreto o índice IPS. Esta metodologia tem sido aplicada na Região desde 2010 para a avaliação da qualidade ecológica das ribeiras (e.g. Gonçalves et al. 2013; Gonçalves et al. 2016b) mas, como referido anteriormente (e.g. Gonçalves et al. 2016a), apesar de a classificação obtida usando unicamente as diatomáceas bentónicas estar em concordância com a maioria dos indicadores de pressão nestes ecossistemas alguns tipos de pressão, especialmente a contaminação por metais pesados, não se refletem nas classificações de estado obtidas. Os macroinvertebrados bentónicos mostraram-se mais sensíveis a esse tipo de pressão ambiental pelo que uma avaliação combinada dos dois elementos biológicos (diatomáceas e macroinvertebrados) produzirá uma classificação do estado ecológico mais consentânea com a realidade ambiental das massas de água da categoria rios.

Assim, para as ribeiras dos Açores a classificação do estado ecológico deve ser baseada em dois elementos: diatomáceas bentónicas e macroinvertebrados bentónicos. Para as diatomáceas bentónicas deverá continuar a ser utilizado o Índice de Poluossensibilidade Específica (IPS; Cemagreff, 1982) com o valor de referência e RQEs nas fronteiras entre classes de estado indicadas no PGRH Açores (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de referência e fronteiras entre estados de qualidade para as ribeiras dos Açores com base no elemento biológico diatomáceas bentónicas.

Categoria de massa de água	Índice adoptado	Valor de referência	Exc./Bom (RQE)	Bom/Raz. (RQE)
----------------------------	-----------------	---------------------	----------------	----------------

Ribeiras	IPS	19	17 (0,89)	12 (0,63)
----------	-----	----	--------------	--------------

Para o elemento biológico macroinvertebrados bentónicos propõe-se a utilização da Entropia de Rényi como indicador do estado ecológico das ribeiras dos Açores. Os valores de referência máximo e mínimo utilizados no cálculo dos EQRs foram os máximos e mínimos dentro dos valores observados nas ribeiras seleccionadas.

Com base na análise dos resultados, pode-se perceber que era necessário a criação de um novo índice, e para tal foi desenvolvido o índice intitulado Rényi EQR score (1):

$$(1) \text{REQRscore} = (\% \text{Excelente} * 0,9) + (\% \text{Bom} * 0,7) + (\% \text{Razoável} * 0,5) + (\% \text{Medíocre} * 0,3) + (\% \text{Mau} * 0,1)$$

Onde o percentual geral de classificação em cada um dos 5 níveis de EQR obtido nos 11 níveis da entropia de Rényi foi utilizado como fator de ponderação da contribuição do EQR para o Rényi EQR score multiplicado pelo valor médio do respectivo EQR (Excelente = 0,9; Bom = 0,7; Razoável = 0,5; Medíocre = 0,3; Mau = 0,1), daqui resultando que o Rényi EQR score varia entre 10 e 90. Para o estabelecimento do valor do Rényi EQR score nas fronteiras entre as classes de estado (Tabela 8) dividiu-se o intervalo de variação do índice em cinco partes, onde pontuações de 10 a 26 indicam o estado Mau, de 26 a 42 o estado Medíocre, de 42 a 58 o estado Razoável, de 58 a 74 o estado Bom e de 74 a 90 o estado Excelente.

Tabela 8. Valores fronteira entre estados de qualidade para as ribeiras dos Açores com base no elemento biológico macroinvertebrados bentónicos.

Categoria de massa de água	Índice adoptado	Exc./Bom	Bom/Raz.	Raz./Med.	Med./Mau
Ribeiras	Rényi EQR score	74	58	42	26

A classificação final do estado ecológico com base nos elementos biológicos corresponderá à pior classificação obtida para as diatomáceas bentónicas e macroinvertebrados bentónicos.

3. Estudo piloto para a validação de métodos de quantificação de DNA ambiental para a monitorização das comunidades piscícolas nas lagoas dos Açores

3.1. Introdução

A Diretiva Quadro da Água (DQA) considera a fauna piscícola com elemento biológico de qualidade para a avaliação do estado ecológico das massas de água interiores de superfície (EC Parliament and Council 2000). O valor deste elemento biológico como indicador de qualidade é reconhecido há muito tempo pela comunidade científica (e.g. Caussé et al. 2011), pelo que é largamente utilizado em programas de monitorização de rotina em diversos países europeus e americanos (Meador & Goldstein 2003; Argillier et al. 2012; Lyche-Solheim et al. 2013). Apesar disso, a monitorização das comunidades piscícolas nas massas de água interiores dos Açores nunca foi implementada por diversos fatores. Por um lado, todos os peixes de água doce, com exceção para a enguia (*Anguilla anguilla*), são espécies exóticas que foram sucessivamente introduzidas pelo homem desde os finais do séc. XVIII não representando, por isso, as condições pristina dos ecossistemas (Gonçalves et al. 2008). Por outro lado, os métodos tradicionais de monitorização das comunidades piscícolas, através de pesca eléctrica ou redes de emalhar com malhas múltiplas (CEN 2005; INAG 2008), são financeiramente exigentes o que dificultou a sua implementação por questões financeiras.

Por outro lado, a aplicação de técnicas de quantificação de DNA ambiental (i.e. “environmental” DNA ou eDNA) surge como um método alternativo que tem mostrado resultados muito interessantes no que diz respeito à detecção rápida de organismos em ambientes de água doce (Thomsen et al. 2012). As técnicas de eDNA consistem em amplificar sequências de DNA partindo de amostras de água com o intuito de detectar espécies de interesse mesmo quando as espécies-alvo estão presentes em baixas abundâncias - como é o caso de espécies raras ou ameaçadas (Ficetola et al. 2008). Estudos recentes demonstraram que existe uma relação quantitativa entre a densidade ou biomassa de diferentes espécies de peixes e a quantidade de DNA presente em cada amostra (Kelly et al. 2014). Este tipo de análises permite estabelecer uma aproximação das abundancias relativas das várias espécies de peixe em cada massa de água. Uma das grandes vantagens metodologia é a sua repetibilidade e reduzido esforço em termos de recursos humanos. Por exemplo a amostragem das comunidades piscícolas de uma

lagoa, utilizando métodos tradicionais, pode requerer a participação de 2-4 pessoas durante vários dias. As técnicas de eDNA requerem apenas um utilizador para recolher amostras de água em cada lagoa o que pode permitir a amostragem de várias lagoas por dia. Tendo em conta o elevado número de publicações recentes neste tema, acompanhadas por um enorme desenvolvimento tecnológico, as técnicas de eDNA estão a tornar-se uma ferramenta essencial em planos de monitorização ambiental e detecção de espécies invasoras.

3.2. Metodologia

3.2.1. Recolha de DNA

Foram recolhidas amostras de água para a obtenção de DNA ambiental (eDNA) em três a cinco locais das lagoas onde foram colocadas redes para a amostragem da fauna piscícola (Cánario, Rasa das Sete Cidades, Fogo e Verde), sempre previamente à colocação das redes. Utilizaram-se dois métodos de amostragem do eDNA: método de precipitação com etanol e método de filtração. Recolheu-se igualmente material biológico (músculo) de cada uma das espécies de peixe capturas para construção da respetiva livreria genética.

Para a recolha de eDNA pelo método de precipitação com etanol prepararam-se previamente *kits* de amostragem com todo o material esterilizado dentro de sacos herméticos para evitar contaminações cruzadas. Para cada local prepararam-se dois *kits*: um contendo 3 Falcons vazios de 50 ml, esterilizados, e um par de luvas pulverizadas com álcool para evitar a contaminação antes da utilização no campo; outro com 3 Falcons de 50 ml, esterilizados, com reagentes (33,5 mL de etanol a 96% + 1,5 mL de Acetato de Sódio 3M) para a precipitação do DNA, e um par de luvas pulverizadas com álcool. No local de amostragem foram abertos os dois kits respetivos e calçadas as luvas. Os Falcons vazios para a recolha da amostra foram abertos dentro da água da lagoa, para evitar a contaminação, e depois de cheios verteu-se o excesso de água até alcançar o volume pretendido de aproximadamente 15 mL. Imediatamente adicionaram-se os reagentes preparados no outro *kit* perfazendo um volume final de aproximadamente 50 ml. Em cada local de amostragem foram recolhidas três amostras. As amostras foram imediatamente acondicionadas em caixas térmicas com gelo até à chegada ao laboratório sendo então armazenadas a -20°C até à extração do DNA.

Para a recolha de eDNA pelo método de filtração recolheram-se 3x 1 L de água em frascos de vidro previamente esterilizados, utilizando sempre luvas esterilizadas durante a amostragem para evitar contaminações. Os frascos foram abertos e fechados

submersos para evitar a contaminação. Imediatamente após a recolha foram colocá-los em gelo até filtração. Para a filtração utilizaram-se filtros de microfibra de vidro do tipo Whatman GF/C com 47 milímetros de diâmetro. Sempre que foi necessário devido à colmatção do filtro, usaram-se vários filtros para filtrar a totalidade da água. Os filtros foram colocados em tubos com álcool 96% e conservados a -20°C até à extração do DNA.

Para a recolha de amostras de DNA de cada uma das espécies de peixe presentes nas lagoas retirou-se uma porção de músculo, aproximadamente 2x2x1 cm, de pelo menos cinco exemplares de cada espécie. Cada amostra de músculo foi colocada num saco hermético esterilizado, devidamente identificado (lago, espécie, data e nome do projeto), e armazenado a -20°C até a extração do DNA.

3.2.2. Amostragem da fauna piscícola

A amostragem da fauna piscícola foi efetuada com redes de emalhar de malhas múltiplas, seguindo a norma EN 14757 (CEN 2005). Nas lagoas Empadadas Norte, Cánario e Rasa das Sete Cidades, tendo em conta a sua pequena área e profundidade, foram colocadas apenas 3 redes bentónicas em 3 pontos selecionados aleatoriamente. Nas lagoas Fogo e Verde, considerando a sua área e profundidade, foram utilizadas redes bentónicas e plantónicas em vários locais e profundidades. Na Tabela 9 indica-se o número e tipo de redes aplicadas em cada lagoa. No total das cinco lagoas foram lançadas e recolhidas 82 redes.

Tabela 9. Número e tipo de redes utilizado em cada uma das lagoas amostradas.

Tipo de Rede	Empadadas Norte	Canário	Rasa da Serra Devassa	Fogo	Verde
Bentónica	3	3	3	42	24
Planctónica	0	0	0	4	3

As redes foram colocadas ao fim do dia, com o auxílio de uma pequena embarcação, e permaneceram na água aproximadamente 12 horas. Após a recolha das redes o peixe foi identificado, medido e pesado.

3.3. Resultados

Em relação à fauna piscícola estudada pelo método de redes de emalhar de malhas múltiplas, o resumo dos resultados das capturas de peixe nas lagoas estudadas é apresentado nas Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10. Valores de biomassa absoluta (gramas), biomassa relativa (gramas/hectare) e abundância (numero de indivíduos) das espécies capturadas nas lagoas Canário, Empadadas Norte e Rasa das Sete Cidades.

Espécie	Canário			Empadadas Norte			Rasa das Sete Cidades		
	Biomassa absoluta (g)	Biomassa relativa (g/ha)	Abundância (n)	Biomassa absoluta (g)	Biomassa relativa (g/ha)	Abundância (n)	Biomassa absoluta (g)	Biomassa relativa (g/ha)	Abundância (n)
<i>Achondrostoma oligolepis</i> (Ruivaca)	240	120	41	-	-	-	-	-	-
<i>Caracius auratus</i> (Pimpão)	-	-	-	534	267	3	-	-	-
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa)	1678	839	5	-	-	-	-	-	-
<i>Micropterus salmoides</i> (Achigã)	7	4	1	1323	661	8	438	219	5
<i>Rutilus rutilus</i> (Ruivo)	-	-	-	2084	1042	20	-	-	-
Total	1925	963	47	3940	1970	31	438	219	5

Tabela 11. Valores de biomassa absoluta (gramas), biomassa relativa (gramas/hectare) e abundância (numero de indivíduos) das espécies capturadas nas lagoas Fogo e Verde.

Espécie	Fogo			Verde		
	Biomassa absoluta (g)	Biomassa relativa (g/ha)	Abundância (n)	Biomassa absoluta (g)	Biomassa relativa (g/ha)	Abundância (n)
<i>Achondrostoma oligolepis</i> (Ruivaca)	12402	811	797	-	-	-
<i>Caracius auratus</i> (Pimpão)	6132	401	61	-	-	-
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa)	67114	4386	164	62698	7290	27
<i>Esox lucius</i> (Lúcio)	-	-	-	24501	2849	16
<i>Micropterus salmoides</i> (Achigã)	38	2	1	-	-	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Truta arco íris)	87707	5733	519	-	-	-
<i>Perca fluviatilis</i> (Perca)	-	-	-	46070	5357	459
<i>Rutilus rutilus</i> (Ruivo)	-	-	-	31547	3668	1091
<i>Truta fario</i> (Truta fário)	2054	134	11	-	-	-
Total	175447	11467	1553	164816	19164	1593

As lagoas profundas (Fogo e Verde) foram as que apresentaram maior biomassa total e relativa. Na lagoa Verde foi registada a maior biomassa relativa de peixes entre as lagoas estudadas com um valor de 19164 g/ha, logo seguida da lagoa do Fogo com 11467 g/ha. Nas lagoas pouco profundas a biomassa relativa foi significativamente menor, com valores de aproximadamente 2000 g/ha na lagoa das Empadadas Norte, 1000 g/ha na lagoa do Canário e 129 g/ha na lagoa Rasa das Sete Cidades.

3.4. Discussão

A distribuição das espécies de peixe pelas lagoas é muito desigual, resultando de introduções pontuais e pouco coordenadas, associadas a condições ambientais diferenciadas (e.g. estado trófico) que favorecem o desenvolvimento de determinadas espécies em detrimento de outras. Por exemplo, na lagoa do Fogo o menor estado trófico e, consequentemente, a melhor qualidade da água, permite ainda a existência de espécies mais sensíveis à degradação da qualidade da água como são os casos da truta arco-íris, da truta fário e do achigã. Enquanto as duas primeiras espécies só se encontram nesta lagoa apesar de já terem sido introduzidas noutras lagoas (e.g. lagoa Verde), o Achigã está presente também em todas as lagoas pouco profundas estudadas, apesar de em baixas densidades. Esta foi, aliás, a única espécie encontrada na lagoa Rasa das Sete Cidades. As carpas são dominantes nas lagoas Verde e Canário e sub dominantes na lagoa do Fogo, embora as ruivacas (lagoas do Canário e Fogo) e os ruivos (lagoa Verde) sejam mais abundantes nestas lagoas mas devido ao seu menor tamanho contribuem menos para a biomassa total de peixes.

4. Estudo do potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares. Implementação de um sistema de alerta para a prevenção de riscos para a saúde pública

4.1. Introdução

As cianobactérias são um grupo filogenético de microrganismos unicelulares, procariotas, gram-negativos, de grande diversidade morfológica e grande importância ecológica (Whitton & Potts 2012). Distinguem-se de outros procariotas por realizarem fotossíntese aeróbia, semelhante à das plantas superiores (Shevela et al. 2013; Whitton & Potts 2012). Dependendo das condições ambientais, as cianobactérias podem apresentar elevadas taxas de crescimento, produzindo os chamados *blooms* (Dittmann et al. 2013; Merel et al. 2013). Condições mais favoráveis de temperatura, luz e nutrientes são fatores referidos como indutores de *blooms* de cianobactérias (Chorus & Bartram 1999).

As florescências de algas prejudiciais, os designados *harmful algal blooms* (HABs), são uma preocupação pública a nível mundial, uma vez que muitas espécies de algas e cianobactérias têm a capacidade de produzir toxinas (Dittmann et al. 2013; O'Neil et al. 2012).

As toxinas produzidas por cianobactérias, conhecidas por cianotoxinas (Sarma 2013), têm uma ação prejudicial numa grande diversidade de organismos, incluindo humanos (Chorus et al. 2000). A presença de cianotoxinas nas massas de água pode causar danos com a sua utilização, seja esta para a produção de água de abastecimento, para lazer ou outras (Paerl 2008). O risco de danos associados à utilização de águas doces é maior, uma vez que as cianobactérias se adaptam melhor a este tipo de águas. Os HBAs, e as cianotoxinas que destes advêm, afetam não só o dinamismo das massas de água, como a saúde de eucariotas e têm também um efeito nefasto em termos económicos e sociais, i.e., podem causar efeitos negativos em oportunidades de lazer, a redução de locais de pesca, a redução de fontes de abastecimento de água para consumo humano e para a agropecuária e podem levar a custos elevados para os tratamentos de remoção de cianobactérias e cianotoxinas (Hoagland et al. 2002; Paerl 2008).

Nem todas as espécies de cianobactérias são produtoras de toxinas, no entanto, os métodos tradicionalmente utilizados na monitorização de massas de água não

distinguem as espécies produtoras das não produtoras (Bartram & Chorus 1999), pelo que os métodos taxonómicos de monitorização não garantem a segurança na utilização das massas de água, o que torna o risco iminente de intoxicação das águas um grave problema (Dittmann et al. 1997; Rantala-Ylinen et al. 2011). Este facto é particularmente relevante nas massas de água utilizadas para abastecimento ou fins recreativos em que o controlo da sanidade da água é uma necessidade absoluta. Para ultrapassar esta limitação dos métodos tradicionais (determinação da abundância e biomassa fitoplanctónica), foram introduzidos métodos químicos de quantificação das toxinas na água que, no entanto, são morosos, dispendiosos e não permitem implementar um sistema de alerta precoce pois só detetam as toxinas quando estas já estão presentes no sistema em quantidades significativas.

Na monitorização da presença de cianotoxinas nas lagoas dos Açores, feita no âmbito da Rede de Monitorização Operacional das Lagoas dos Açores, têm sido utilizados métodos químicos, como HPLC, e biológicos, como abundância e biomassa de cianobactérias (SRAM 2005) e apenas as microcistinas têm sido consideradas. Como alternativa a estes métodos podem ser aplicados métodos moleculares, capazes de identificar genes responsáveis pela produção desta e de outras toxinas (e.g. saxitoxinas, anatoxinas, cilindrospermopsinas) de modo mais rápido e mais económico (e.g. Ouahid et al. 2005; Pearson & Neilan 2008; Zhang et al. 2014).

Tendo em consideração que são frequentes os blooms de cianobactérias nas águas superficiais dos Açores (e.g. Gonçalves et al. 2005, 2006, 2007), que estudos anteriores demonstraram a existência de microcistinas em concentrações elevadas (e.g. Santos et al. 2005, 2012), que algumas destas águas são utilizadas para a produção de água para consumo humano e para fins recreativos e que as cianotoxinas colocam em risco a saúde humana, pretende-se desenvolver metodologias para o alerta precoce do risco de exposição a cianotoxinas através da aplicação de métodos moleculares (como PCR e eletroforese de DNA) em articulação com os métodos tradicionais (quantificação da biomassa fitoplanctónica, abundância e composição taxonómica das cianobactérias e quantificação de toxinas).

O estudo do potencial para a produção de cianotoxinas nas águas superficiais do Arquipélago dos Açores é executado em articulação com a Monitorização das Massas de Água Interiores e de Transição da Região Hidrográfica dos Açores (Contrato N.º 23/DRA/2014). Devido ao atraso no início dos trabalhos da monitorização só foi possível iniciar este estudo em outubro de 2015, apresentando-se neste relatório os

resultados obtidos para as amostras colhidas na campanha de outono de 2015 e inverno de 2016 da referida monitorização.

4.2. Metodologia

4.2.1. Amostragens

Foram analisadas no total 15 lagoas, 12 da ilha de São Miguel (Lagoa Verde, Lagoa Azul, Lagoa das Empadadas Sul, Lagoa das Empadas Norte, Lagoa Rasa da Serra Devassa, Lagoa do Canário, Lagoa de Santiago e Lagoa Rasa das Sete Cidades, Lagoa do Fogo, Lagoa do Congro, Lagoa de São Brás e Lagoa das Furnas) duas da ilha do Pico (Lagoa do Caiado e Lagoa do Capitão) e uma da ilha das Flores (Lagoa Funda). As amostras analisadas para o presente relatório foram colhidas entre outubro de 2015 e outubro de 2016, correspondentes a cinco campanhas (outono de 2015 e inverno, primavera, verão e outono de 2016) da rede de monitorização da qualidade das massas de água interiores e de transição da Região Hidrográfica dos Açores.

Todas as amostragens foram feitas nas margens das lagoas com recurso a uma rede de fitoplâncton com porosidade de 10 μm , de modo a que a amostra tivesse maior concentração de organismos. Cada amostra foi guardada em frascos esterilizados de 50 ml.

4.2.2. Extração e quantificação de DNA

A análise molecular iniciou-se com a extração de DNA diretamente de amostras ambientais. O protocolo utilizado para a extração de DNA (realizado até um máximo de 24 horas após colheita) foi adaptado de Singh et al. (2011), um protocolo com base no detergente CTAB próprio para a extração de DNA de cianobactérias.

Após cada extração as amostras de DNA foram analisadas para quantificar e avaliar a qualidade do DNA extraído por espectrofotometria, usando o Nanodrop 2000 (*ThermoScientific*) e por eletroforese de DNA em géis de agarose (0,8%) a uma voltagem constante de 100V (revelação com SYBR® Safe (*Invitrogen*) através de um transiluminador *Molecular Imager® - Gel Doc™ XR+*).

4.2.3. Confirmação da presença de DNA de cianobactérias

A análise por PCR (reação em cadeia da polimerase) foi feita inicialmente para *screening* da presença de DNA pertencente a cianobactérias nas amostras ambientais. Para tal, foi feita a amplificação do fragmento do gene produtor da ficocianina (PC-IGS) e a amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA comum a todas as cianobactérias. Para

a detecção do fragmento do gene PC-IGS foi utilizado o par de primers cpcB-A e para o 16S rDNA o par de primers 27F/809R, como indicado na Tabela 12.

As amplificações por PCR destes genes foram realizadas conforme indicado pelos autores dos respetivos primers (Neilan et al. 1995; Neilan et al. 1997; Jungblut et al. 2005). Para os primers do gene da ficocianina (PC-IGS) as condições de PCR encontram-se descritas no relatório RP1. As condições de PCR do par de primer 27F/809R, para amplificação do fragmento do gene 16S rDNA, foram as seguintes: desnaturação inicial a 92°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 92°C (desnaturação), 30 segundos a 50°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), por fim a extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C. A composição do mix de reação encontra-se descrita na Tabela 13.

Para a análise dos produtos amplificados recorreu-se a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem constante de 100 V. Os géis foram revelados com SYBR® Safe (Invitrogen) através de um transiluminador *Molecular Imager® - Gel Doc™ XR+* (BioRad).

Tabela 12. Pares de primers utilizados para a detecção dos genes produtores de cianotoxinas e confirmação da presença de DNA de cianobactérias.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
PC-IGS	PCβ-F	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	47	685	Neilan et al. 1995
	PCα-R	CCAGTACCAGCAACTAA			
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	50	780	Neilan et al. 1997
	809R	GCTTCGGCACGGCTCGGTCGATA			Jungblut et al. 2005
mcvA	cDF	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA	50	297	Bittencourt-Oliveira et al. 2010
	cDR	AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT			
mcvB	FAA	CTATGTTATTTATACATCAGG	50	758	Neilan et al. 1999
	RAA	CTCAGCTTAACTTGATTATC			
mcvC	PSCF1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	52	674	Ouahid et al. 2005
	PSCR1	CCGACAACATCACAAGGC			
mcvD	PKDF1	GACGCTCAAATGATGAAAC	52	647	Ouahid et al. 2005
	PKDR1	GCAACCGATAAAAACTCCC			
mcvE	PKEF1	CGCAAACCCGATTTCAG	52	755	Ouahid et al. 2005
	PKER1	CCCCTACCATCTTCATCTTC			
mcvG	PKGf1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC	52	425	Ouahid et al. 2005
	PKGR1	AATCGCTAAAACGCCACC			
sxtA	sxtA F	AGGTCTTTGACTTGTCATCCAA	58	602	Ledreux et al. 2010
	sxtA R	AACCGGCGACATAGATGATA			
anaC	anaC-Gen F	CTGGTATTTCAGTCCCCTCTAT	50	366	Rantala-Ylinen et al. 2011
	anaC-Gen R	CCCAATAGCCTGTCAATCAA			
aoaB	M13	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC	55	597	Schembri et al. 2001
	M14	GATGGAACATCGCTCACTGGTG			
cyrJ	cynsulfF	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC	57	780	Mihali et al. 2008
	cynsulfR	GAGTGAAAATGCGTAGAAGTTG			
aoaB	M4	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	55	650	Schembri et al. 2001
	M5	AATCCTTACGGGATCCGGTGC			
aoaA	AMTF	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG	50	1105	Kellmann et al. 2006
	AMTR	TTAGGGAAGTAATCTTCACAG			

Tabela 13. Composição do *mix* de reação para o par de *primer* 27F/809R (Costa 2011)

Componentes	Quantidades-base (µl)
Tampão 10X	2
MgCl ₂ 50mM	1
dNTPs 10mM	0,5
Taq Polimerase	0,1
<i>Primers</i>	2 (x2)
Amostra	1
H ₂ O	11,4
Total	20

4.2.4. Amplificação por PCR de genes produtores de cianotoxinas

4.2.4.1. *Microcistinas*

Na detecção de genes produtores de microcistina (MC) usaram-se pares de primers para amplificação dos genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* (Tabela 12), seguindo as condições de amplificação descritas pelos respetivos autores (Neilan et al. 1999; Ouahid et al. 2005; Bittencourt-Oliveira et al. 2010) (ver relatório RP1).

4.2.4.2. *Neurotoxinas*

Para a detecção de genes produtores de neurotoxinas, nomeadamente anatoxina-a (ATX-a) e saxitoxina (STX), usaram-se pares de primers para a amplificação dos genes *anaC* e *sxtA*, respetivamente (Tabela 12), seguindo as condições de amplificação indicadas pelos autores dos respetivos primers (Ledreux et al. 2010; Rantala-Ylinen et al. 2011) (ver relatório RP1).

4.2.4.3. *Cilindrospermopsinas*

Na detecção de genes produtores de cilindrospermopsinas (CYN) usaram-se pares de primers para amplificação dos genes *aoaA*, *aoaB* e *CyrJ* (Tabela 12), adotando as condições de amplificação usadas pelos autores dos referidos primers (Schembri et al. 2001; Kellmann et al. 2006; Mihali et al. 2008).

As condições de amplificação por PCR convencional para *CyrJ*, foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 57°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), por fim a extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

As condições de amplificação por PCR convencional para *aoaB*, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 90 segundos a

95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (hibridação) e 50 segundos a 72°C (extensão), por fim a extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

As condições de amplificação por PCR convencional para *aoaA*, foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 50°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), por fim a extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

A composição dos mix de reação para os pares de primers da análise de cilindrospermopsinas encontra-se descrita na Tabela 14.

Tabela 14. Composição do mix de reação para os pares de primers M13/M14, M4/M5, AMTF/AMTR, *cynsulfF/cylnamR* (Kellmann et al., 2006; Mankiewicz-Boczec et al., 2011)

Componentes	Quantidades-base (µl)	
	<i>M13/M14; M4/M5; AMTF/AMTR</i>	<i>cynsulfF/cylnamR</i>
Tampão 10X	2	2,5
MgCl ₂ 50mM	1	1
dNTPs 10mM	0,5	0,5
Taq Polimerase	0,1	0,2
Primers	2 (x2)	1 (x2)
Amostra	1	1
H ₂ O	11,4	12,8
Total	20	20

Para análise dos produtos amplificados recorreu-se a eletroforese em géis de agarose (1,5-2%) a uma voltagem constante de 100 V. Os géis foram revelados com SYBR® Safe (*Invitrogen*), através de um transiluminador *Molecular Imager® - Gel Doc™ XR+* (*BioRad*).

4.3. Resultados

4.3.1. Quantificação de DNA extraído

Os resultados quantitativos e qualitativos das amostras de DNA, após extração das amostras ambientais, estão apresentados na Tabela 15 e nas Figura 13 a 16. A quantificação por espectrofotometria foi realizada apenas nas duas primeiras campanhas e os respetivos resultados foram apresentados no RP2.

O método de extração utilizado produz resultados positivos, sendo possível extrair DNA das amostras ambientais. Em todas as campanhas as bandas obtidas por eletroforese de

DNA total são nítidas e não têm arrastamento, o que significa que o processo de extração foi eficaz e conseguiu-se obter DNA de boa qualidade, sem contaminantes. No entanto, a maioria são bandas ténues o que sugere pouca quantidade de DNA.

Com a exceção da lagoa do Congro no outono de 2015, da lagoa Rasa da Serra Devassa na primavera de 2016, da lagoa Rasa das Sete Cidades no outono de 2015 e 2016 e no inverno de 2016, e da lagoa do Caiado no outono de 2015, foi detetado DNA total em todas as amostras extraídas (Tabela 15). A Lagoa Rasa das Sete Cidades foi a que apresentou mais resultados negativos para a extração de DNA ambiental, o que se justifica se tratar de uma lagoa oligotrófica com reduzida biomassa de fitoplâncton (Gonçalves et al. 2016a).

Tabela 15. Detecção por eletroforese do DNA extraído das amostras ambientais. n.a. não amostrado; - DNA não detetado; + DNA detetado.

Ilha	Lagoa		Eletroforese DNA Total				
			Out 15	Inv 16	Prim 16	Ver 16	Out 16
São Miguel	Lagoa Verde	VMi	+	+	+	+	+
	Lagoa Azul	AMi	+	+	+	+	+
	Lagoa do Congro	CGMi	-	+	+	+	+
	Lagoa de São Brás	SBMi	+	+	+	+	+
	Lagoa do Fogo	FGMi	+	+	+	+	+
	Lagoa Rasa da Serra Devassa	RSSDMi	+	+	-	+	+
	Lagoa Rasa das Sete Cidades	RSSCMi	-	-	+	(+)	-
	Lagoa das Empadadas Norte	ENMi	+	+	+	+	+
	Lagoa das Empadadas Sul	ESMi	+	+	+	+	+
	Lagoa do Canário	CNMi	+	+	+	+	+
	Lagoa de Santiago	STMi	+	n.a.	n.a.	+	+
	Lagoa das Furnas	FRMi	+	+	+	+	+
Pico	Lagoa do Caiado	CDPi	-	+	+	+	+
	Lagoa do Capitão	CPPi	+	+	+	+	+
Flores	Lagoa Funda	FNFo	+	+	+	+	+

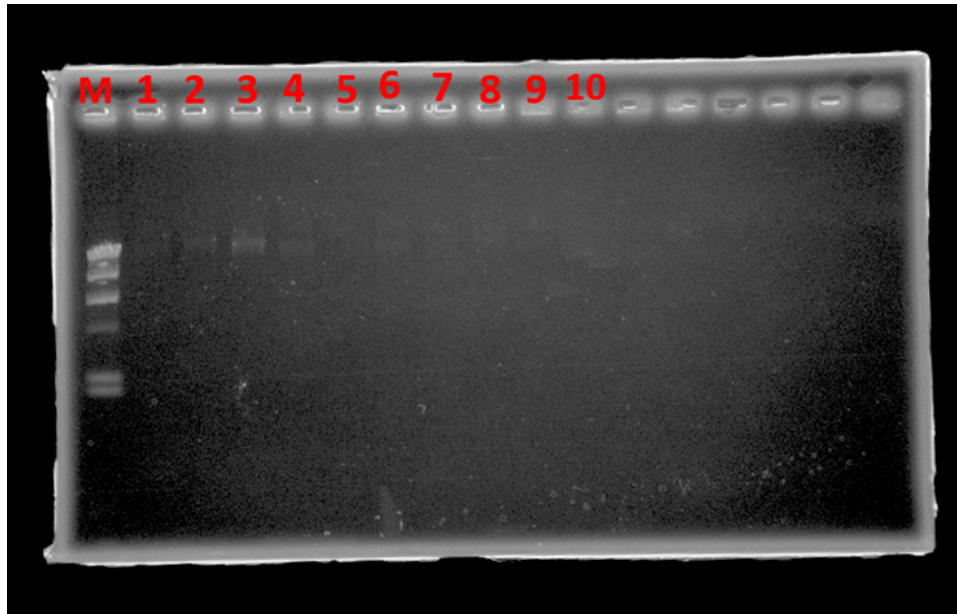


Figura 13. Eletroforese de DNA total. M-marcador 1 kb (Solis BioDyne); 1-ENMI1015C; 2-ESMI1015C; 3-RSDMI1015C; 4-CNMI1015C; 5-RSCMI1015C; 6-STMI1015C; 7-FRMI1015C; 8-CPPI1015C; 9-CDPI1015C; 10-Controlo Negativo.

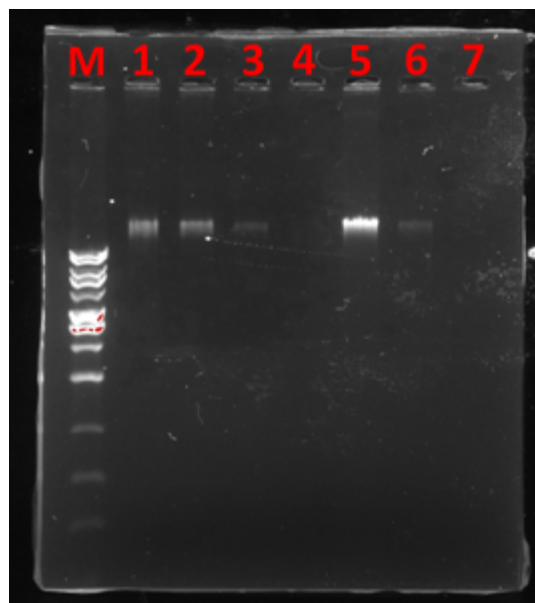


Figura 14. Eletroforese de DNA total. M-marcador 1 kb (Solis BioDyne); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-FNFO1015C; 7-Controlo Negativo.

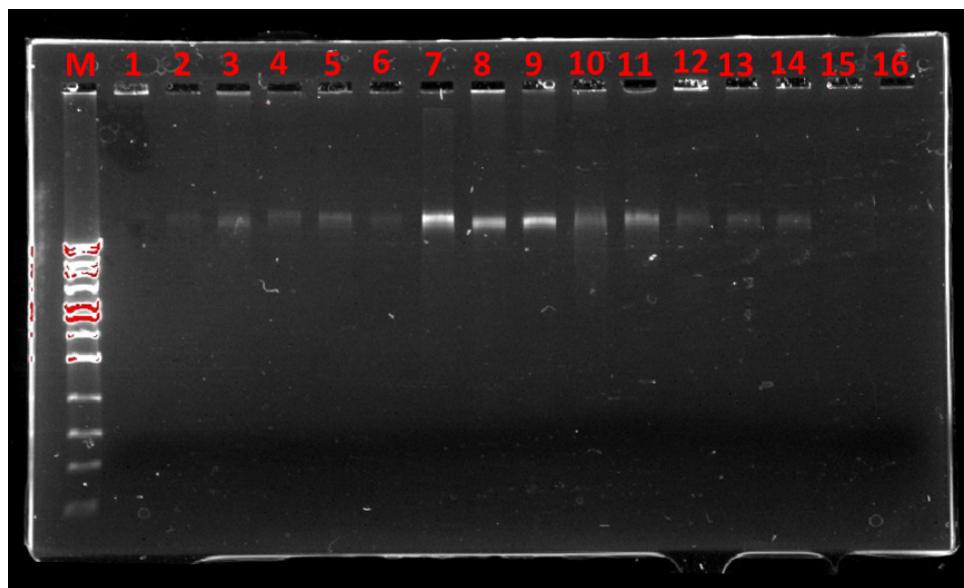


Figura 15. Eletroforese de DNA total. M-marcador 1 kb (Solis BioDyne); 1- RSCMI0216C; 2- RSDM0216C; 3-ESMI0216C; 4-ENMI0216C; 5-CNMI0216C; 6-SBMI0216C; 7-FRMI2016C; 8-CGMI0216C; 9-FGMI0216C; 10-VMIO216C; 11-AMIO216C; 12-CPPI0316C; 13-CDPI0316C; 14-FNFO0316C; 15- Controlo Negativo.

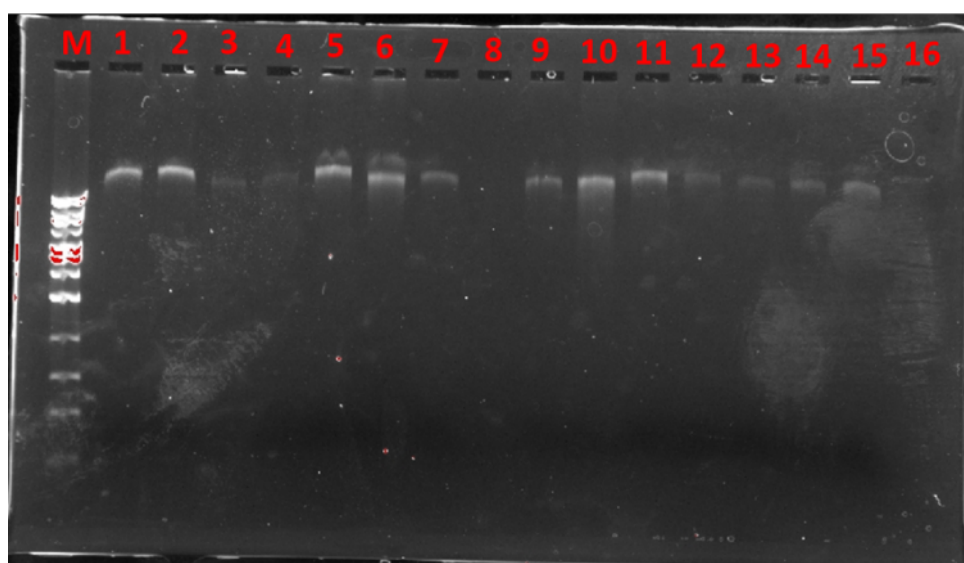


Figura 16. Eletroforese de DNA total. M-marcador 1 kb (Solis BioDyne); 1-CGMI1016C; 2- RSDM1016C; 3-ESMI1016C; 4-ENMI1016C; 5-CNMI1016C; 6-SBMI1016C; 7-FRMI1016C; 8-RSCMI1016C; 9-FGMI1016C; 10-VMIO16C; 11-AMIO16C; 12-CPPI1016C; 13-CDPI1016C; 14-FNFO1016C; 15-STMI1016C; 16-Controlo Negativo.

4.3.2. Deteção do gene produtor de ficocianinas e do gene 16S rDNA

Da PCR feita com o par de primer PC β -F/PC α -R, para amplificação do gene produtor de ficocianinas (Figura 17), foi possível confirmar a presença do gene PC-IGS apenas nas amostras das lagoas Verde, Congro, São Brás, Fogo, Santiago e Funda na campanha de outono de 2015 e nas lagoas Capitão e Funda na campanha de inverno de 2016 (Tabela

16). Tanto na campanha de inverno como na de outono, verificou-se também ausência de amplificação deste gene em amostras com amplificações para genes produtores de cianotoxinas. Tendo em conta estes resultados decidiu-se recorrer a outra região do genoma das cianobactérias para identificar DNA destes organismos nas amostras, nomeadamente o gene 16S rDNA.

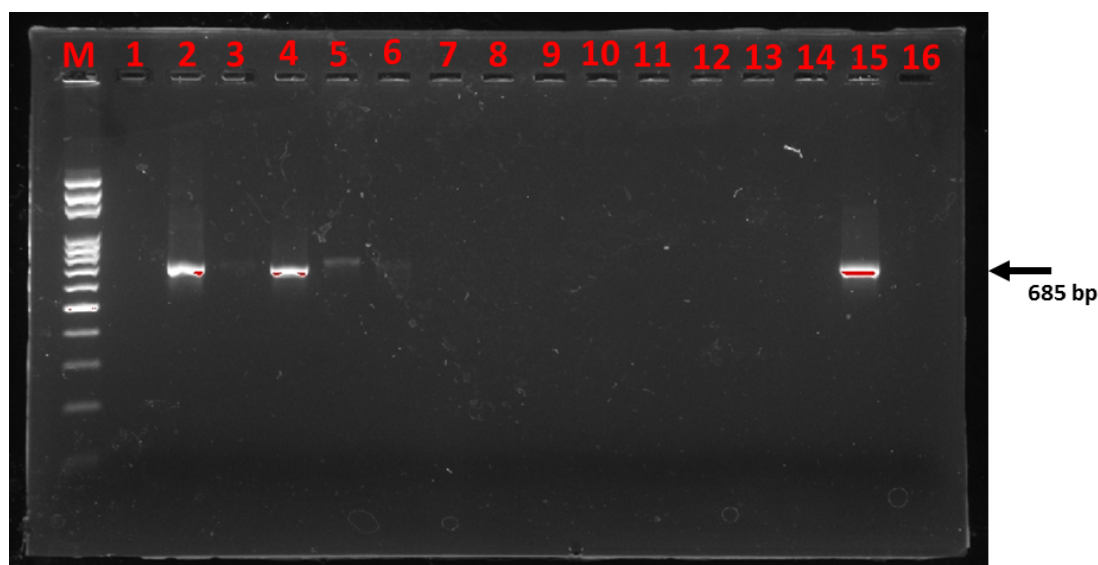


Figura 17. Eletroforese após PCR com o par de primer cpcB-A (685bp). M-marcador 100bp (Solis BioDyne); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-STMI1015C; 7-RSDMI1015C; 8-RSCMI1015C; 9-ENMI1015C; 10-ESMI1015C; 11-CNMI1015C; 12-FRMI1015C; 13-CDPI1015C; 14-CPPI1015C; 15-FNFO1015C; 16-Controlo Negativo.

Utilizando a região 16S rDNA como marcador da presença de DNA de cianobactérias foi possível a sua confirmação na maioria das amostras (Tabela 16). Ao longo das campanhas verifica-se a ausência de DNA de cianobactérias nas lagoas do Caiado, Rasa da Serra Devassa, Rasa das Sete Cidades, Empadadas Norte e Empadadas Sul, Canário e do Fogo. Porém a ausência da amplificação da região 16S ou da região PC-IGS não significa ausência, na totalidade, de cianobactérias nestas lagoas, significando apenas que na amostra testada não foi possível extração de DNA destes organismos, devido à sua baixa abundância ou ausência (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados da PCR com o par de *primer* para amplificação do gene produtor de ficocianinas (PC-IGS) e do gene 16S rDNA. - não amplificado; + amplificado; n.a. não analisado.

Lagoa	PC-IGS Out15 (PCβ-F/PCα-R)	16S rDNA Inv16 (27F/809R)	16S rDNA Pri16 (27F/809R)	16S rDNA Ver16 (27F/809R)	16S rDNA Out16 (27F/809R)
VMi	+	+	+	+	+
AMi	-	-	+	+	+
CGMi	+	+	+	+	+
SBMi	+	-	+	-	+
FGMi	+	+	+	-	-
RSSDMi	-	+	-	-	-
RSSCMi	-	-	+	-	-
ENMi	-	+	-	-	-
ESMi	-	+	-	-	-
CNMi	-	+	-	-	-
STMi	+	n.a.	n.a.	+	+
FRMi	-	+	+	+	+
CDPi	-	-	-	-	-
CPPi	-	+	+	+	+
FNFo	+	+	+	+	+

4.3.3. Detecção de genes produtores de microcistinas

Na determinação da potencialidade de produção de MC, verificou-se a presença de genes produtores destas hepatotoxinas nas lagoas dos Açores, através da amplificação de genes produtores (Tabela 17). As amostras cujos resultados foram negativos para a amplificação da região PC-IGS ou 16S rDNA, não foram testadas por PCR para os genes produtores destas hepatotoxinas, devido à ausência de DNA de cianobactérias.

Ao longo das campanhas foi possível amplificação de genes *mcy* em 6 lagoas, sendo comum a presença de genes deste cluster nas lagoas Verde, Congro e Furnas. Na Tabela A2 dos Anexos pode-se verificar os resultados detalhados, por campanha, para todos os genes procurados do cluster *mcy*. O gene amplificado em mais amostras foi o *mcyE*, ao contrário dos genes *mcyB* e *mcyA* que foram os menos amplificados (ver Tabela A2), o que nos poderá indicar que o gene *mcyE* será um bom marcador para a deteção do potencial de produção de microcistinas.

Observando os resultados ao longo das campanhas verifica-se que é constante a presença de genes produtores de MC nas lagoas Verde, Congro e Furnas. Embora não em todas as estações, também estão presentes estes genes nas lagoas de São Brás, Rasa das Sete Cidades e Azul, confirmando assim que nestas lagoas também existe potencial para a produção de microcistinas.

Tabela 17. Resultados da PCR com os pares de *primers* para amplificação dos genes produtores de microcistina. - não amplificado; + amplificado; n.a. não analisado.

Lagoa	MC				STX				ATX-a						
	Out 15	Inv 16	Pri 16	Ver 16	Out 16	Out 15	Inv 16	Pri 16	Ver 16	Out 16	Out 15	Inv 16	Pri 16	Ver 16	Out 16
VMi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AMi	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
CGMi	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
SBMi	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FGMi	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
STMi	-	n.a.	n.a.	-	-	+	n.a.	n.a.	-	+	+	n.a.	n.a.	-	-
RSSDMi	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RSSCMi	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENMi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESMi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNMi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRMi	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CDPi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPPi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ENFo	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-

Através das Figura 18 e 19 pode-se observar as amplificações dos genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* nas campanhas de outono de 2015 e inverno de 2016, respetivamente. Embora umas bandas sejam mais ténues do que outras a presença do gene confirma-se pelo tamanho do fragmento amplificado.

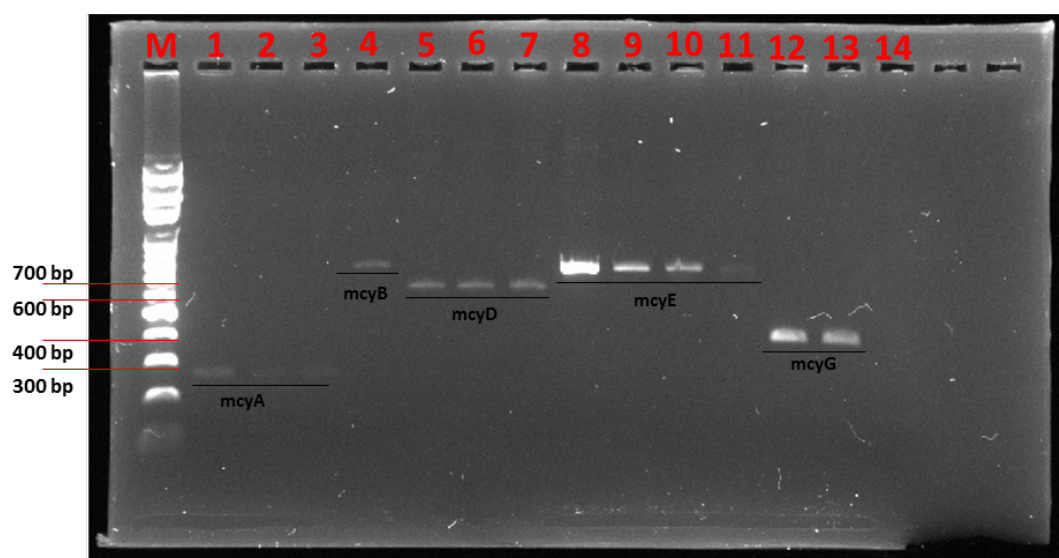


Figura 18. Eletroforese após PCR com os pares de *primers* para amplificação dos genes produtores de microcistina (*mcyA*-297bp; *mcyB*-758bp; *mcyD*-647bp; *mcyE*-755bp; *mcyG*-425bp). M-marcador 100bp (Solis BioDyne); 1-SBMI1015C (*mcyA*); 2-CGMI1015C (*mcyA*); 3-FRMI1015C (*mcyA*); 4-FRMI1015C (*mcyB*); 5-VMi1015C (*mcyD*); 6-SBMI1015C (*mcyD*); 7-CGMI1015C (*mcyD*); 8-VMi1015c (*mcyE*); 9-SBMI1015C (*mcyE*); 10-CGMI1015C (*mcyE*); 11-FRMI1015C (*mcyE*); 12-VMi1015C (*mcyG*); 13-CGMI1015C (*mcyG*); 14-Controlo Negativo.

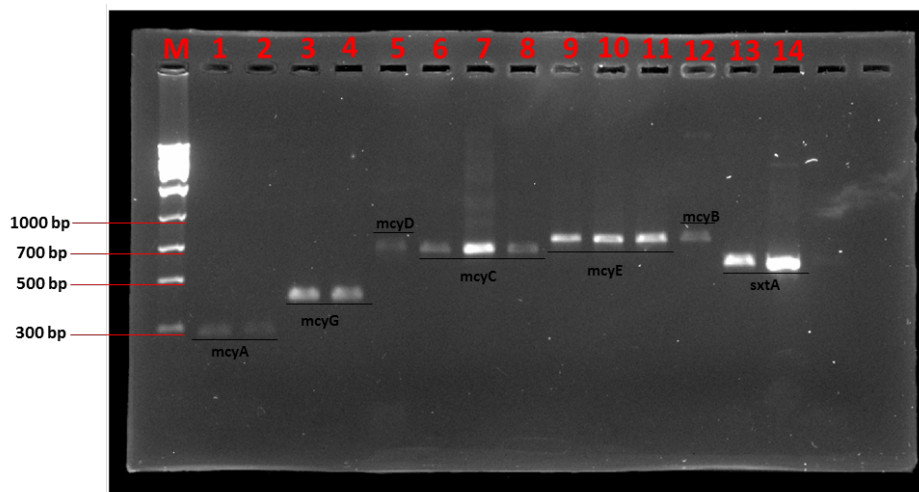


Figura 19. Eletroforese após PCR com pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina (*mcyA*-297bp; *mcyG*-425bp; *mcyD*-647bp; *mcyC*-674bp; *mcyE*-755bp; *mcyB*-758bp) e saxitoxina (*sxtA*-602bp). M-marcador 1kb (Solis BioDyne); 1- VMI0216C (*mcyA*); 2-FRMI0216C (*mcyA*); 3-VMI0216C (*mcyG*); 4-FRMI0216C (*mcyG*); 5- VMI0216C (*mcyD*); 6-VMI0216C (*mcyC*); 7- FRMI0216C (*mcyC*); 8- CGMI0216C (*mcyC*); 9- VMI0216C (*mcyE*); 10- FRMI0216C (*mcyE*); 11- CGMI0216C (*mcyE*); 12- FRMI0216C (*mcyB*); 13- VMI0216C (*sxtA*); 14- FNFO0316C (*sxtA*).

4.3.4. Detecção de genes produtores de neurotoxinas

O potencial de produção de STX verificou-se nas lagoas dos Açores, através da amplificação do gene *sxtA* (Figura 20). Foi possível a amplificação deste gene e a extrapolação do potencial de produção de STX nas lagoas Verde, Funda, Azul, Congro e Santiago e, embora apenas com uma amplificação, também nas lagoas do São Brás, Fogo, Rasa da Serra Devassa, Furnas e Capitão (Tabela 18). O gene *sxtA* foi assim amplificado em 10 das 15 lagoas estudadas, confirmando o perigo de produção desta cianotoxina numa elevada percentagem das lagoas dos Açores.

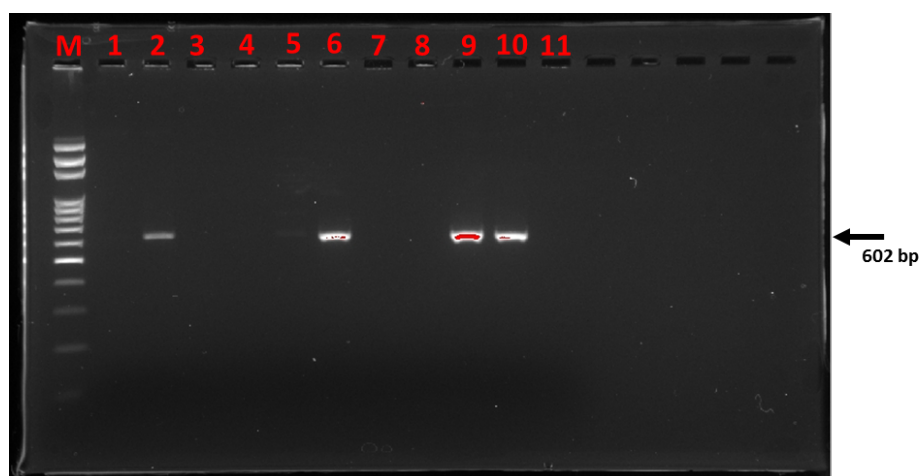


Figura 20. Eletroforese após PCR com o par de primer *sxtA* (602bp). M-marcador 100bp (Solis BioDyne); 1-AMI1015C; 2-VMI1015C; 3-SBMI1015C; 4-CGMI1015C; 5-FGMI1015C; 6-STMI1015C; 7-FRMI1015C; 8-CPPI1015C; 9-FNFO1015C; 10-Controlo Positivo; 11-Controlo Negativo.

Tabela 18. Resultados da PCR com os pares de *primers* para amplificação dos genes produtores de saxitoxina. - não amplificado; + amplificado; NT não testado; n.a. não amostrado.

Lagoa	<i>sxtAF/sxtAR</i>				
	Outono 15	Inverno 16	Primavera 16	Verão 16	Outono 16
VMi	+	+	+	+	+
AMi	-	-	+	+	+
CGMi	-	-	+	-	+
SBMi	-	NT	+	NT	-
FGMi	(+)	+	-	-	NT
RSSDMi	NT	+	NT	NT	NT
RSSCMi	NT	NT	-	NT	NT
STMi	+	n.a.	n.a.	-	+
ENMi	NT	-	NT	NT	NT
ESMi	NT	-	NT	NT	NT
CNMi	NT	-	NT	NT	NT
FRMi	-	-	-	-	+
CDPi	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	-	-	-	-	+
FNFo	+	+	-	+	+

O potencial de produção de ATX-a verificou-se nas lagoas dos Açores, através da amplificação do gene *anaC* (Figura 21). O gene *anaC* foi amplificado em amostras das lagoas das Furnas, de Santiago e Funda, confirmando assim o potencial de produção de ATX-a nas mesmas (Tabela 19).

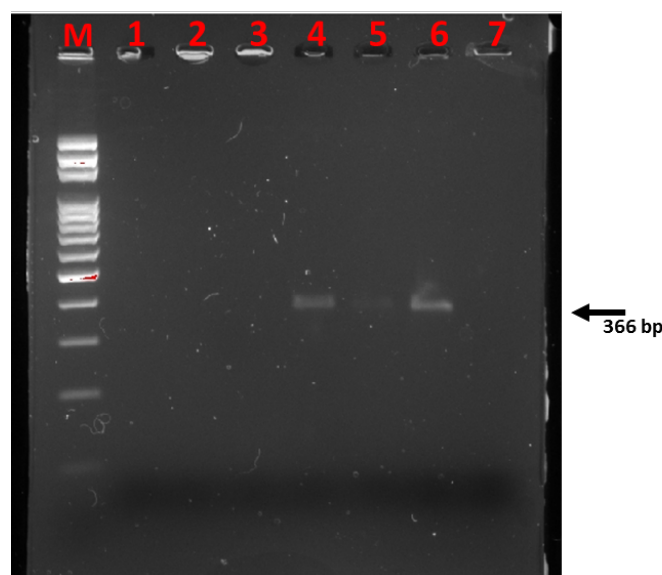


Figura 21. Eletroforese após PCR com o par de primer *anaC* (366bp). M-marcador 100bp (Solis BioDyne); 1-SBMI1015C; 2-CGMI1015C; 3-FGMI1015C; 4-STMI1015C; 5-FRMI1015C; 6-FNFO1015C; 7-Controlo Negativo.

Tabela 19. Resultados da PCR com os pares de *primers* para amplificação dos genes produtores de anatoxina. - não amplificado; + amplificado; NT não testado; n.a. não amostrado.

Lagoa	anaC-genF/ anaC-genR				
	Outono 2015	Inverno 2016	Primavera 2016	Verão 16	Outono 16
VMi	-	-	-	-	-
AMi	-	-	-	-	-
CGMi	-	-	-	-	-
SBMi	-	NT	-	NT	-
FGMi	-	-	-	-	NT
RSSDMi	NT	-	NT	NT	NT
RSSCMi	NT	NT	-	NT	NT
STMi	+	n.a.	n.a.	-	-
ENMi	NT	-	NT	NT	NT
ESMi	NT	-	NT	NT	NT
CNMi	NT	-	NT	NT	NT
FRMi	+	-	+	+	+
CDPi	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	-	-	-	-	-
FNFo	+	-	+	+	-

4.3.4. Detecção de genes produtores de cilindrospermopsinas

Embora existam espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de cilindrospermopsinas nas lagoas dos Açores, não se verificou amplificação dos genes produtores de cilindrospermopsinas com nenhum dos pares de primers utilizados em nenhuma das amostras analisadas.

4.4. Discussão

Como os resultados obtidos pela amplificação ou ausência da mesma, para o locus genético PC-IGS, não mostraram ser fiáveis, recorreu-se a um par de *primers* que permitira a amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA, partilhada por todas as cianobactérias (Moreira et al. 2011). Deste modo foi possível confirmar a presença de DNA de cianobactérias em quase todas as amostras. Face a estes resultados deve efetuar-se o *screening* inicial para a presença de DNA de cianobactérias recorrendo ao par de primers 27F/809R para o gene 16S rDNA.

Neste estudo foi possível a amplificação de genes produtores de cianotoxinas, o que confirma o potencial para a produção destas toxinas nas lagoas dos Açores.

Observou-se alguma sazonalidade na presença de DNA de cianobactérias assim como dos genes produtores de toxinas. Contudo não se encontrou nenhum padrão regular comum a todas as lagoas ou toxinas.

As diferenças de resultados entre estações pode dever-se a variabilidade climática e/ou sazonalidade (e.g. alteração da temperatura e intensidade/quantidade de luz) que interfere com a abundância de cianobactérias produtoras e mesmo com a produção de toxinas (Kosten et al. 2012; Merel et al. 2013).

A ausência de genes produtores de cilindrospermopsinas verificou-se em todas as lagoas para as cinco campanhas realizadas. A presença de espécies descritas na literatura como potencialmente produtoras desta toxina, e.g. *Oscillatoria* sp. na lagoa das Furnas (Cordeiro 2015) justifica a necessidade de monitorização desta toxina apesar de até ao momento não terem sido obtidos resultados positivos.

Mais preocupante é a situação relativa às neurotoxinas saxitoxina e anatoxina. Para além de existirem espécies potencialmente produtoras destas toxinas, foram encontrados em várias lagoas os genes produtores das mesmas. No entanto, estas toxinas não são alvo de monitorização regular o que pode por em risco a sua utilização pelo menos para fins recreativos, uma vez que nenhuma delas é usada para a produção de água para consumo humano.

Face aos resultados obtidos, propõe-se a adoção de técnicas moleculares para pesquisa de genes produtores de cianotoxinas nas lagoas dos Açores como forma de deteção precoce da possibilidade da sua presença, minimizando os riscos para os utilizadores dessas massas de água.

Considerando a fiabilidade e rapidez desta metodologia, a sua utilização para *screening* inicial reduziria a utilização de técnicas analíticas para confirmação e quantificação das cianotoxinas apenas às amostras com potencial para a sua produção.

Apresenta-se de seguida uma proposta de monitorização de cianotoxinas nas lagoas dos Açores com recurso a técnicas moleculares.

4.5. Proposta de sistema de alerta para a prevenção de riscos para a saúde pública resultantes da presença de cianotoxinas nas massas de água interiores de superfície da Região Hidrográfica dos Açores

A proposta sistema de alerta para a prevenção de riscos para a saúde pública resultantes da presença de cianotoxinas nas lagoas dos Açores por métodos moleculares compreende seis etapas conforme indicado na Figura 22. Cada uma dessas etapas é descrita em detalhe a seguir.

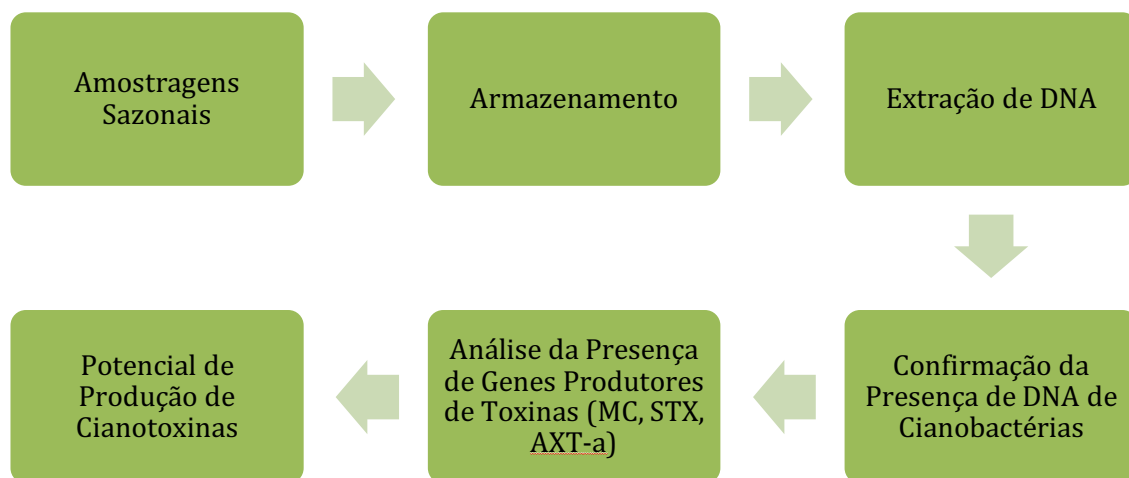


Figura 22. Etapas do sistema de alerta para a prevenção de riscos para a saúde pública resultantes da presença de cianotoxinas nas lagoas dos Açores por métodos moleculares .

1. Amostragem

Colheitas sazonais nas lagoas designadas como vulneráveis

1. Recolher cerca de 50 ml de água com recurso a uma rede de fitoplâncton (porosidade de 10 µm), de modo à amostra colhida ter maior concentração dos organismos presentes nas águas.
2. Recolher cerca de 250 ml de água diretamente da margem da lagoa.
3. Guardar as amostras em frascos esterilizados e analisar até um máximo de 24 horas após colheita.

2. Armazenamento de amostras ambientais - adaptação do Protocolo EMLS (European Multi Lake Survey) para a conservação de amostras para análise de DNA da água dos lagos

1. Antes de cada filtração homogeneizar as amostras por inversão.
2. Filtrar as amostras até saturação dos filtros (cerca de 50-100 ml para águas hipertróficas e 100-250 ml para águas eutróficas e oligotróficas), usar filtros de nitrato de celulose - 0,45 µm.
3. Anotar o volume de água filtrada.
4. Colocar os filtros em tubos de congelamento (cryovials) com etanol a 90%.
5. Repetir o procedimento. Guardar dois filtros de cada lagoa.

6. Guardar a -20°C.

Os filtros preservados servem de reserva das amostras ambientais.

3. Extração de DNA - *PureLink® Genomic DNA Mini Kit*

Extrair DNA do fitoplâncton presente na amostra ambiental, direcionando para a extração de DNA das estirpes de cianobactérias presentes.

Usar o kit de extração *PureLink® Genomic DNA* e seguir o protocolo para extração de bactérias gram negativas:

1. Para extração de DNA de amostras ambientais centrifugar 5 a 15 ml (até obtenção de uma *pellet* ambiental abundante) e proceder para o segundo passo. Para extração de DNA a partir dos filtros preservados em etanol a 90%, cortar os filtros em pequenos pedaços e proceder para o segundo passo.
2. Preparar o banho térmico para 55°C.
3. Resuspender amostras em 180 µl de *Digestion Buffer*, adicionar 20 µl de *Proteinase K* e misturar rapidamente com vortex.
4. Incubar a 55°C, 40 min, vortex ocasionalmente.
5. Adicionar 20 µl de *RNAse A*, misturar rapidamente com vortex e incubar 2 min à temperatura ambiente.
6. Adicionar 200 µl de *Lysis/Binding Buffer*, misturar com vortex até homogeneizar.
7. Adicionar 200 µl de etanol 96-100%, misturar com vortex até homogeneizar.
8. Tirar das embalagens tubos *Spin Column*.
9. Transferir o lisado anterior para um *Spin Colum*.
(se a amostra estiver muito "suja" fazer um *short spin* na centrífuga, antes deste passo)
10. Centrifugar durante 1 min, a 11.100 rpm.
11. Descartar o *collection tube* e colocar o *spin column* num novo *collection tube*.
12. Adicionar 500 µl de *Wash Buffer 1*.
13. Centrifugar durante 1 min, a 11.100 rpm.
14. Descartar o *collection tube* e colocar o *spin column* num novo *collection tube*;
15. Adicionar 500 µl de *Wash Buffer 2*.
16. Centrifugar à velocidade máxima, durante 3 min.
17. 6. Descartar o *collection tube*.
18. Colocar o *spin column* num *ependorf* de 1,5 ml esterilizado.
19. Adicionar 25-200 µl de *Elution Buffer*.
(em amostras mais densas colocar maior volume de *Elution Buffer*)
20. Incubar 1 min à temperatura ambiente e, centrifugar à velocidade máxima durante 1 min. (Para recolher mais DNA repetir passos 19 e 20)
21. Descartar *spin column*.
22. Guardar DNA a -20°C.

4. Avaliação do DNA extraído

Após a extração de DNA de todas as amostras é recomendado realizar uma eletroforese de DNA total, para confirmar e avaliar a qualidade do DNA extraído.

1. Preparar o gel de agarose a 0,8% (0,8g de agarose+ 100 ml de TBE), deixar arrefecer um pouco e adicionar SYBR® Safe (quantidades indicadas pelo fornecedor).
2. Colocar o gel a polimerizar no molde cerca de 40 min.
3. Preparar as amostras, juntar 8 µl de DNA a 2 µl de Azul Bromofenol.
4. Carregar nos poços as amostras de DNA com o Azul Bromofenol.
5. Usar no primeiro poço um *ladder* de 1kb.

6. Deixar correr as amostras cerca de 40 min, parar a corrida quando o Azul Bromofenol estiver quase no fim do gel.
7. Revelar o gel através de um transiluminador.

No gel deverá ser visível bandas acima da primeira banda do *ladder*, bandas sem arrastamento e de intensidade moderada. A intensidade das amostras indica a quantidade de DNA que foi extraído e o arrastamento das mesmas a presença de contaminantes (e.g. proteínas, RNA)

5. Presença de DNA de cianobactérias

Realizar um PCR convencional, para confirmação da presença de DNA de cianobactérias, utilizando um par de *primers* específico para a região 16S rRNA comum a todas as cianobactérias.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	50	780	Neilan <i>et al.</i> , 1997
	809R	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA			Jungblut <i>et al.</i> , 2005

Condições de PCR para o par de *primers* 27F/809R: desnaturação inicial a 92°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 92°C (desnaturação), 30 segundos a 50°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

Composição do *mix* de reação para o par de *primers* 27F/809R (Neilan *et al.*, 1997; Jungblut *et al.*, 2005).

Componentes	Quantidades-base (µl)
	27F/809R
Tampão 10X	2
MgCl ₂ 50mM	1
dNTPs 10mM	0,5
Taq Polimerase	0,1
Primers	2 (x2)
Amostra	1
H ₂ O	11,4
Total	20

Para a análise dos produtos amplificados efetuar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Nas amostras cujos resultados forem positivos (presença de banda) prossegue-se para a detecção de genes produtores de cianotoxinas, sendo excluídas as amostras com resultados negativos.

6. Detecção de genes produtores de Microcistina

Na detecção de genes produtores de Microcistina (MC) realizar PCR convencional com os pares de *primers* que permitem a amplificação dos genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
------	---------------	-------------------	---------	----------------	------------

mcyA	cDF	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA	50	297	Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> , 2010
	cDR	AAAAGTGTTTTATTAGCGGTCAT			
mcyB	FAA	CTATGTTATTTATACATCAGG	50	758	Neilan <i>et al.</i> , 1999
	RAA	CTCAGCTTAACCTTGATTATC			
mcyC	PSCF1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	52	674	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PSCR1	CCGACAACATCACAAGGC			
mcyD	PKDF1	GACGCTCAAATGATGAAAC	52	647	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKDR1	GCAACCGATAAAAACTCCC			
mcyE	PKEF1	CGCAAACCCGATTTACAG	52	755	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKER1	CCCCTACCATCTTCATCTTC			
mcyG	PKGf1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC	52	425	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
	PKGR1	AATCGCTAAAAACGCCACC			

Condições de PCR:

- **PSCF1/PSCR1 (mcyC), PKDF1/PKDR1 (mcyD), PKEF1/PKER1 (mcyE) e PKGF1/PKGR1 (mcyG):** desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 52°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.
- **cDF/cDR (mcyA):** desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 50°C (hibridação) e 30 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 5 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.
- **FAA/RAA (mcyB):** desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 10 segundos a 93°C (desnaturação), 20 segundos a 50°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 5 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

Composição do *mix* de reação dos pares de *primers* utilizados para a amplificação dos genes produtores de microcistina (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2010; Neilan *et al.*, 1999; Ouahid *et al.*, 2005).

Componentes	Quantidades-base (µl)		
	mcyA	mcyB	mcyC, mcyD, mcyE, mcyG
Tampão 10X	2,5	2,5	2,5
MgCl2 50mM	0,75	0,75	0,75
dNTPs 10mM	0,6	0,5	0,5
Taq Polimerase	0,2	0,2	0,2
<i>Primers</i>	0,5 (x2)	0,5 (x2)	0,3 (x2)
Amostra	4	4	4
H ₂ O	10,95	16,05	16,45
Total	20	25	25

Para a análise dos produtos amplificados efetuar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Nas amostras cujos resultados forem positivos (presença de banda) verifica-se que existe potencial de produção de MC.

7. Detecção de genes produtores de Saxitoxina

Na deteção de genes produtores de Saxitoxina (STX) realizar PCR convencional com o par de *primers* que permite a amplificação do gene *sxtA*.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>sxtA</i>	<i>sxtA</i> F	AGGTCTTTGACTTGCATCCAA	58	602	Ledreux <i>et al.</i> , 2010
	<i>sxtA</i> R	AACCGGCGACATAGATGATA			

Condições de PCR para o par de *primers sxtAF/sxtAR*: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a 94°C (desnaturação), 60 segundos a 58°C (hibridação) e 2 minutos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 5 minutos, finalizando por tempo indefinido a 10°C.

Composição do *mix* de reação para o par de *primers sxtAF/sxtAR* (Ledreux *et al.*, 2010).

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

Para a análise dos produtos amplificados efetuar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Nas amostras cujos resultados forem positivos (presença de banda) verifica-se que existe potencial de produção de STX.

8. Detecção de genes produtores de Anatoxina-a

Na detecção de genes produtores de Anatoxina-a (ATX-a) realizar PCR convencional com o par de *primers* que permite a amplificação do gene *anaC*.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>anaC</i>	<i>anaC-gen</i> F	CTGGTATTTCAGTCCCCTCTAT	50	366	Rantala-Ylinen <i>et al.</i> , 2011
	<i>anaC-gen</i> R	CCCAATAGCCTGTCATCAA			

Condições de PCR para o par de *primers anaC-genF/anaC-genR*: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 50°C (hibridação) e 30 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 5 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

A composição do *mix* de reação para o par de *primers anaC-genF/anaC-genR* é igual à composição do par de *primers sxtAF/sxtAR*.

Para a análise dos produtos amplificados efetuar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Nas amostras cujos resultados forem positivos (presença de banda) verifica-se que existe potencial de produção de ATX-a.

9. Detecção de genes produtores de Cilindrospermopsinas

Na deteção de genes produtores de Cilindrospermopsinas (CYN) realizar PCR convencional com os pares de *primers* que permitem a amplificação dos genes *aoaA*, *aoaB* e *cyrJ*.

Gene	Par de primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>aoaB</i>	M13	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC	55	597	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	M14	GATGGAACATCGCTCACTGGTG			
<i>cyrJ</i>	cynsulF	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC	57	780	Mihali <i>et al.</i> , 2008
	cylnamR	GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG			
<i>aoaB</i>	M4	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	55	650	Schembri <i>et al.</i> , 2001
	M5	AATCCTTACGGGATCCGGTGC			
<i>aoaA</i>	AMTF	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG	50	1105	Kellmann <i>et al.</i> , 2006
	AMTR	TTAGGGAAGTAATCTTCACAG			

Condições de PCR:

- **cynsulF/cylnamR (*cyrJ*):** desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 57°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.
- **M4/M5 (*aoaB*) e M13/M14 (*aoaB*):** desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 90 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (hibridação) e 50 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.
- **AMTF/AMTR (*aoaA*):** desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 10 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 50°C (hibridação) e 60 segundos a 72°C (extensão), extensão final a 72°C durante 7 minutos, finalizando por tempo indefinido a 4°C.

Composição do *mix* de reação dos pares de *primers* utilizados para a amplificação dos genes produtores de CYN (Kellmann *et al.*, 2006; Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2011).

Componentes	Quantidades-base (µl)	
	<i>aoaA</i> , <i>aoaB</i>	<i>cyrJ</i>
Tampão 10X	2	2,5
MgCl ₂ 50mM	1	1
dNTPs 10mM	0,5	0,5
<i>Taq</i> Polimerase	0,1	0,2
<i>Primers</i>	2 (x2)	1 (x2)
Amostra	1	1
H ₂ O	11,4	12,8
Total	20	20

Para a análise dos produtos amplificados efetuar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Nas amostras cujos resultados forem positivos (presença de banda) verifica-se que existe potencial de produção de CYN.

10. Presença e quantificação de Cianotoxinas

Em todas as amostras cujos resultados indicam potencial de produção de MC, STX, ATX-a e CYN deverá ser feita a identificação e quantificação das toxinas por metodologias analíticas (e.g. HPLC).

5. Referências bibliográficas

- AHA/SRAM. 2011. *Plano de Gestão da Região Hidrográfica dos Açores - relatório técnico - versão pública*. Ponta Delgada.
- Argillier, C., S. Caussé, M. Gevrey, S. Pédrón, J. Bortoli, S. Brucet, M. Emmrich, E. Jeppesen, T. Lauridsen, T. Mehner, M. Olin, M. Rask, P. Volta, I. J. Winfield, F. Kelly, T. Krause, A. Palm, and K. Holmgren. 2012. Development of a fish-based index to assess the eutrophication status of European lakes. *Hydrobiologia* 704:193-211.
- Bartram J., and I. Chorus. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, New Fetter Lane, London, 400pp.
- Bittencourt-Oliveira, M.; Piccin-Santos, V. & Gouvêa-Barros, S. (2010). Microcystin-Producing Genotypes from Cyanobacteria in Brazilian Reservoirs. *Environ Toxicol*, **27**(8):461-471
- Brandão E. 2008. *Cianobactérias e Saúde Pública no Brasil*. Dissertação de mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 76pp.
- Cáceres, M. D. & P. Legendre. 2009. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* 90(12):3566-3574.
- Caussé, S., M. Gevrey, S. Pédrón, S. Brucet, K. Holmgren, M. Emmrich, J. De Bortoli, and C. Argillier. 2011. WISER Deliverable 3.4-4: Fish indicators for ecological status assessment of lakes affected by eutrophication and hydromorphological pressures, European Commission, 46pp. available at: <http://www.wiser.eu/download/D3.4-4.pdf>.
- CEN, 2005. *Water Quality – Sampling of Fish with Multimesh Gillnets*. European Committee for Standardization, EN 14757, Brussels.
- Chorus, I. & Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: F & FN Spon, WHO, 400.
- Chorus, I.; Falconer, I.; Salas, H. & Bartram, J. 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Jpn J Tox Env Health*, **3**: 323-347.

- Cordeiro, R. (2015). Detecção do potencial cianotóxico em águas superficiais do Arquipélago dos Açores através de métodos moleculares. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Ponta Delgada. Departamento de Biologia, Universidade dos Açores.
- Costa, M.S.R. 2011. Cianobactérias marinhas: toxicidade face a fitoplâncton e invertebrados marinhos; toxicidade face a bactérias; citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais humanas. Tese de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais. Universidade do Porto.
- Dittmann, E.; Fewer, D. & Neilan, B. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Ver.*, **37**: 23-43.
- Dittmann, E.; Neilan, B.; Erhard, M.; von Dohren, H. & Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.*, **26**(4): 779-787.
- Dolédéc, S., N. Phillips, M. Scarsbrook, R. H. Riley, and C. R. Townsend. 2006. Comparison of structural and functional approaches to determining landuse effects on grassland stream invertebrate communities. *Journal of the North American Benthological Society* 25:44-60.
- EC Parliament and Council. 2000. *Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy*. Official Journal of the European Communities 327:1-72.
- Ficetola, G. F., C. Miaud, F. Pompanon, and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4):423-425.
- Gayraud, S., B. Statzner, P. Bady, A. Haybachp, F. Schöll, P. Usseglio-Polatera, and M. Bacchi. 2003. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an initial assessment of alternative metrics. *Freshwater Biology* 48:2045-2064.
- Gonçalves, V., A. Costa, P. Raposeiro, and H. Marques. 2005. *Caracterização Biológica das Massas e Água Superficiais das Ilhas de São Miguel e Santa Maria*. Centro de Conservação e Proteção do Ambiente, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Gonçalves, V., P. Raposeiro, A. C. Costa, H. Marques, V. Malhão, J. Michael, and A. Cunha. 2006. *Caracterização ecológica das massas de água interiores das ilhas de São Miguel e*

- Santa Maria da Região Autónoma dos Açores*. Departamento de Biologia/Centro de Conservação e Proteção do Ambiente, Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Gonçalves, V., P. Raposeiro, A. Costa, H. Marques, V. Malhão, J. Micael, and A. Cunha. 2007. *Caracterização ecológica das massas de água interiores das ilhas de Pico, Faial, Flores e Corvo da Região Autónoma dos Açores*. Definição de ecótipos de lagoas e ribeiras. CCPA, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Gonçalves, V., P. Raposeiro, and A. C. Costa. 2008. Benthic diatoms and macroinvertebrates in the assessment of the ecological status of Azorean streams. *Limnetica* 27:317-328
- Gonçalves, V., Raposeiro, P. & Costa, A.C. 2013. Monitorização das Massas de Água Interiores da Região Hidrográfica Açores. R7-Relatório comparativo (Massas de Água Interiores Superficiais). CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 39pp.
- Gonçalves V, Raposeiro PM, Marques H, Vilaverde J, Balibrea A, Luz R, Costa AC (2016a). *Monitorização das Massas de Água Interiores e de Transição da Região Hidrográfica dos Açores. Relatório Anual do Ano 1 (R5/Ano 1)*. CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 45pp.
- Gonçalves V, Raposeiro PM, Marques H, Vilaverde J, Balibrea A, Luz R, Costa AC (2016b). *Monitorização das Massas de Água Interiores e de Transição da Região Hidrográfica dos Açores. Relatório de Síntese do Ano 1 (R6/Ano 1)*. CIBIO Açores, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 28pp.
- Hoagland, P.; Anderson, D.; Kaoru, Y. & White, A. (2002). The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries Coasts*, **25**: 819-837.
- Hughes, S. J. & B. Malmqvist, 2005. Atlantic island freshwater ecosystems: challenges and considerations following the EU Water Framework Directive. *Hydrobiologia* 544:289-297.
- INAG. 2008. *Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segundo a Directiva Quadro da Água - Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P., Lisboa.

- 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., Lisboa, 29.
- Jungblut, A-D.; Hawes, I.; Mountfort, D.; Hitzfeld, B.; Dietrich, D.; Burns, B. & Neilan, B. (2005). Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ Microbiol*, **7**(4): 519-529.
- Kellmann, R.; Mills, T. & Neilan, B. (2006). Functional Modeling and Phylogenetic Distribution of Putative Cylindrospermopsin Biosynthesis Enzymes. *J Mol Evol*, **62**: 267-280.
- Kelly, M. G. 1998. Use of the trophic diatom index to monitor eutrophication in rivers. *Water Research* 32:236-242.
- Kelly, M. & B. Whitton. 1995. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology* 7:433-444.
- Kelly R.P., J.A. Port, K.M. Yamahara, and L.B. Crowder. 2014. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* 9(1):e86175.
- Kosten, S.; Huszar V.; Bécares, E.; Costa L.; Van Donk, E.; Hansson, L.-A.; Jeppesen, E.; Kruk, C.; Lacerot, L.; Mazzeo, N.; Meester, L.; Moss, B.; Lürling, M.; Nöges, T.; Romo, S. & Scheffer, M. (2012). Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Glob Change Biol*, **18**: 118-126.
- Ledreux, A.; Thomazeau, S.; Catherine, A.; Duval, C.; Yéprémian C.; Marie, A. & Bernard, C. (2010). Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae*. **10**: 88-97.
- Lyche-Solheim, A., C. K. Feld, S. Birk, G. Phillips, L. Carvalho, G. Morabito, U. Mischke, N. Willby, M. Søndergaard, S. Hellsten, A. Kolada, M. Mjelde, J. Böhmer, O. Miler, M. T. Pusch, C. Argillier, E. Jeppesen, T. L. Lauridsen, and S. Poikane. 2013. Ecological status assessment of European lakes: a comparison of metrics for phytoplankton, macrophytes, benthic invertebrates and fish. *Hydrobiologia* 704:57-74.
- Meador, M.R., and R.M. Goldstein. 2003. Assessing water quality at large geographic scales: relations among land use, water physicochemistry, riparian condition, and fish community structure. *Environ Manage* 31:504-517.

- Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baurès, E. & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int*, **59**: 303-327.
- Mihali, T.; Kellmann, R.; Muenchhoff, J.; Barrow, K. & Neilan, B. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 716-722.
- Moreira, C.; Martins, A.; Moreira, C. & Vasconcelos, V. (2011). Toxigenic cyanobacteria in volcanic lakes and hot springs of a North Atlantic island (S. Miguel, Azores, Portugal). *Fresen Environ Bull*, **20**(2): 420-426.
- Neilan, B.; Dittmann, L.; Rouhiainen, L.; Bass, R.; Schaub, V.; Sivonen, K. & Börner, T. (1999). Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxigenicity of Cyanobacteria. *J Bacteriol*, **181**(13): 4089-4097.
- Neilan, B.; Jacobs, D.; Dot, T.; Blackall, L.; Hawkins, P.; Cox, P. & Goodman, A. (1997). rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol*, **47**(3): 693-697.
- Neilan, B.; Jacobs, D. & Goodman, A. (1995). Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. *Appl Environ Microb*, **61**(11): 3875-3883.
- O'Neil, J.; Davis, T.; Burford, M. & Gobler, C. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, **14**: 313-334.
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs & H. Wagner. 2016. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-1. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ouahid, Y.; Pérez-Silva, G. & del Campo, F. (2005). Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environ Toxicol*, **20**(3): 235-242.
- Pacheco, D. M., A. Malcata & S. C. Mendes, 2013. *Monitorização da qualidade da água das lagoas de São Miguel. Comparação de resultados entre 2009 e 2012*. Governo dos Açores, Ponta Delgada.

- Paerl, H. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. *In: Hudnell, H. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. 1ªEd., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: Springer, 217-237.
- Pearson, L. & Neilan, B. (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotech*, **19**: 281-288.
- Potapova, M. & D. F. Charles, 2007. Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators* 7(1):48-70
- Raposeiro, P. M. 2011. *Comunidades de macroinvertebrados dos sistemas lóticos dos Açores - Uma perspectiva ecológica e taxonómica*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Rantala-Ylinen, A.; Känä, S.; Wang, H.; Rouhiainen, L.; Wahlsten, M.; Rizzi, E.; Berg, K.; Gugger, M. & Sivonen, K. (2011). Anatoxin-a Synthetase Gene Cluster of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and Molecular Methods to Detect Potential Producers. *Appl Environ Microb*, **77**(20): 7271-7278.
- Santos, M. C. R., D. Pacheco, F. Santana, and H. Muelle. 2005. Cyanobacteria blooms in Sete-Cidades lake (S. Miguel Island - Azores). *Algological Studies* 117:393-406.
- Santos, M.; Muelle, H. & Pacheco, D. (2012). Cyanobacteria and microcystins in lake Furnas (S. Miguel island-Azores). *Limnetica*, **31**(1): 107-118.
- Sarma, T. (2013). *Handbook of Cyanobacteria*. 1ª Ed. Boca Raton: CRC Press, 803.
- Schembri, M.; Neilan, B.; & Saint, C. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*, **16**: 413-421.
- Shevela, D.; Pishchalnikov, R.; Eichacker, L. & Govindjee (2013). Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. *In: Srivastava, A.; Rai, A. & Neilan, B. Stress Biology of Cyanobacteria, Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. 1ª Ed. Nova Iorque: CRC Press, 3-40.
- Singh, S.; Rastogi, R.; Häder, D-P. & Sinha, R. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, **27**: 1225-1230.

- SRAM, 2005. *Monitorização da Qualidade da Água das Lagoas de São Miguel*. Direcção Regional do Ordenamento do Território e dos Recursos Hídricos, Governo Regional dos Açores, 175pp.
- Thomsen P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T. Gilbert, L. Orlando, and E. Willerslev. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol* 21(11):2565-2573
- Usseglio-Polatera, P., M. Bournaud, P. Richoux, and H. Tachet. 2000. Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species trait databases? *Hydrobiologia* 422-423:153-162.
- van Loon, W. & D. Walvoort. 2015. BEQI2: Benthic Ecosystem Quality Index 2. R package version 2.0-0. <https://CRAN.R-project.org/package=BEQI2>
- WFD CIS Working Group 2.3 (ed) 2003. *Guidance document nº 10. Rivers and lakes - Typology, reference conditions and classification systems*. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC).
- Whitton, B. & Potts, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton, B. *The Ecology of Cyanobacteria II - Their Diversity in Time and Space*. 1ª Ed. Springer, 1-13.
- Zhang, W., I. Lou, W. K. Ung, Y. Kong, and K. M. Mok. 2014. Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir. *Frontiers of Earth Science* 8:291-301.

Anexos

Tabela A1. *Traits*, suas classes e respectivas abreviaturas usadas nos modelos RLQ e *fourth-corner*.

<i>Trait</i>	Classes do <i>trait</i>	Abreviatura no RLQ	Associação com o Eixo 1 (p adj. - FDR)	Associação com o Eixo 2 (p adj. - FDR)
Tamanho máximo (mm)	< 2,5	2,5mm	< 0,01**	< 0,05*
	2,5 - 5	2,5_5mm	0,09	0,15
	5 - 10	5_10mm	< 0,05*	0,97
	10 - 20	10_20mm	< 0,001***	0,34
	20 - 40	20_40mm	0,46	0,94
	40 - 80	40_80mm	1,00	0,93
	> 80	80mm	0,90	0,86
Duração do ciclo de vida	< 1 ano	Less_1yr	< 0,01**	0,09
	> 1 ano	More_1yr	0,88	0,06
Número potencial de ciclos de reprodução por ano	< 1	Less_1	0,90	0,87
	1	1	< 0,001***	0,41
	> 1	More_1	0,12	0,81
Estados aquáticos	Ovo	Egg	0,27	0,13
	Larva	Larvae	0,41	0,34
	Pupa	Pupa	< 0,05*	0,06
	Adulto	Adult	< 0,01**	0,10
Reprodução	Ovoviviparo	Ovoviv,	0,79	0,68
	Ovos isolados, livre	Iso,egg,free	< 0,05*	< 0,05*
	Ovos isolados, agregado	Iso,egg,cem,	0,17	0,86
	Ninhadas, agregado ou fixo	Clu,cem,	< 0,001***	0,59
	Ninhadas, livre	Clu,free	0,10	0,11
	Ovos ou ninhadas, na vegetação (endofítico)	Endoph,	0,77	0,72
	Ninhadas, terrestre	Clu,ter,	0,92	< 0,05*
	Reprodução assexuada	Asex,	< 0,001***	< 0,05*
	Partenogenese	Patherno,	1	1
Dispersão	Aquática passiva	Aq,pass,	0,08	0,79
	Aquática ativa	Aq,actv,	< 0,01**	0,42
	Aérea passiva	Ae,pass,	< 0,001***	0,64
	Aérea ativa	Ae,actv,	< 0,01**	0,11

Forma de resistência	Ovos, estatoblastos, gémulas	Egg,stato,gemm,	< 0,001***	0,08
	Casulos	Coccons	< 0,01**	0,06
	Células resistentes à dissecação	Desicc,	1	1
	Diapausa ou dormência	Diap,dorm,	< 0,001***	0,25
	Nenhuma	Resist,none	0,81	< 0,05*
Alimento	Sedimento fino + microrganismos	Fine,microorg,	< 0,01**	0,06
	Detritos < 1mm	Detrit,	0,49	0,94
	Detritos vegetais > 1mm	Plant,detrit,	0,15	0,81
	Micrófitos vivos	L,microph,	< 0,01**	0,07
	Macrófitos vivos	L,macroph,	0,25	< 0,05*
	Animais mortos > 1mm	Dead,animal	< 0,05*	0,42
	Microinvertebrados vivos	L,microinv,	p < 0,05*	p = 0,42
	Macroinvertebrados vivos	L,macroinv,	0,49	0,88
	Vertebrados	Vertb,	0,54	0,80
Hábitos de alimentação	Absortivos	Abs,	1	0,93
	Deposit feeder	Deposit,f,	< 0,001***	0,36
	Detritívoros	Shredder	0,08	0,68
	Raspadores	Scraper	< 0,001***	0,12
	Filtradores	Filter,f,	< 0,01**	1
	Mineiros (plantas ou animais)	Piercer	0,09	0,27
	Predador	Pred,	0,18	0,71
	Parasita, parasitoide	Parasite-oid	< 0,05*	< 0,05*
Respiração	Tegumento	Tegu,	< 0,05*	0,51
	Brânquias	Gill	< 0,05*	0,13
	Plastrão	Plastron	0,68	0,90
	Espiráculo (aéreo)	Spiracle	< 0,001***	0,25
	Vesícula hidrostática (aéreo)	H,vesicle	1	1
Temperatura	Frio (<15°C)	Cold	0,40	0,05
	Quente (> 15°C)	Warm	0,10	< 0,05*
	Euritérico	Eurytherm,	0,10	0,35
pH	< 4	pH,4	< 0,05*	0,15

	> 4 – 4,5	pH,4_4,5	< 0,001***	0,25
	> 4,5 – 5	pH,4,5_5	< 0,05*	0,49
	> 5 – 5,5	pH,5_5,5	0,12	0,46
	> 5,5 – 6	pH,5,5_6	0,13	0,44
	> 6	pH,6	0,12	0,66
Trofia	Oligotrófico	Oligotroph,	< 0,001***	0,33
	Mesotrófico	Mesotroph,	0,32	0,34
	Eutrófico	Eutroph,	0,87	0,93
Saprobia	Xenosapróbico	Xeno,	0,94	< 0,05*
	Oligosapróbico	Oligo,	0,96	0,06
	β-Mesosapróbico	β-Meso,	0,28	0,09
	α-Mesosapróbico	α-Meso,	< 0,05*	0,40
	Polysapróbico	Poly,	0,15	0,64
Distribuição longitudinal	Crenon	Crenon	< 0,001***	0,62
	Epirithron	Epirithron	0,16	0,94
	Metarithron	Metarithron	0,44	0,42
	Hyporithron	Hyporithron	1	0,25
	Epipotamon	Epipotamon	< 0,001**	0,13
	Metapotamon	Metapotamon	< 0,001***	0,55
	Estuário	Estuary	< 0,001***	0,71
	Fora do rio	Outside,riv,	0,25	< 0,05*
Substrato	Blocos, pedras, seixos	Fla,bou,cob,peb,	< 0,01**	0,35
	Gravilha	Gravel	< 0,001***	0,42
	Areia	Sand	< 0,001***	0,49
	Fino	Silt	< 0,001***	0,44
	Macrófitos	Macroph,	0,21	0,60
	Micrófitos	Microph,	< 0,001***	0,25
	Galhos, raízes	Twigs,roots	< 0,001***	0,34
	Detritos orgânicos, folhada	Org,det,	0,06	< 0,05*
	Lama	Mud	< 0,01**	0,46
Locomoção e relação com substrato	Voador	Flier	0,91	1
	Nadador superficial	Surf,swimm,	0,17	0,78
	Nadador	Swimmer	< 0,001***	0,31
	Rastejante	Crawler	0,13	< 0,05*

	Furador (epibêntico)	Burrower	< 0,001***	0,21
	Intersticial (endobêntico)	Intersticial	<0,001***	0,80
	Temporariamente fixo	Temp,attach,	< 0,001***	0,88
	Permanentemente fixo	Perm,attach,	< 0,01**	< 0,05*
Velocidade da corrente	Nula	Null,current	< 0,001***	0,36
	Lenta (< 25 cm.s ⁻¹)	Slow,current	< 0,01**	< 0,05*
	Moderada (25 – 50 cm.s ⁻¹)	Mod,current	0,09	0,85
	Rápida (> 50 cm.s ⁻¹)	Fast,current	< 0,05*	0,82

Tabela A2. Resultados da PCR com os pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina, campanha de outono de 2015. - gene não amplificado; + gene amplificado; NT não testada.

Lagoa	Amostra	mcy A	mcy B	mcy C	mcy D	mcy E	mcy G
		cdF/ cdR	FAA/ RAA	PSCF1/ PSCR1	PKDF1/ PKDR1	PKEF1/ PKER1	PKGf1/ PKGR1
VMi	AMI1015C	NT	NT	-	-	-	-
AMi	VMi1015C	NT	NT	-	+	+	+
CGMi	CGMi1015C	+	-	-	+	+	+
SBMi	SBMi1015C	+	-	-	+	+	-
FGMi	FGMi1015C	NT	NT	-	-	-	-
STMi	STMi1015C	NT	NT	-	-	-	-
RSSCMi	RSCMi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSDMi	RSDMi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ENMi	ENMi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ESMi	ESMi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CNMi	CNMi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
FRMi	FRMi1015C	+	+	-	-	+	-
CDPi	CDPi1015C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	CPPi1015C	NT	NT	-	-	-	-
FNFo	FNFO1015C	-	-	-	-	-	-

Tabela A3. Resultados da PCR com os pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina, campanha de inverno de 2016. - gene não amplificado; + gene amplificado; NT não testada.

Lagoa	Amostra	mcy A	mcy B	mcy C	mcy D	mcy E	mcy G
		cdF/ cdR	FAA/ RAA	PSCF1/ PSCR1	PKDF1/ PKDR1	PKEF1/ PKER1	PKGf1/ PKGR1
VMi	VMi0216C	+	-	+	+	+	+
AMi	AMi0216C	-	NT	NT	-	NT	-
CGMi	CGMi0216C	-	-	+	+	+	-
SBMi	SBMi0216C	-	-	-	-	-	-
FGMi	FGMi0216C	-	-	-	-	-	-
RSSDMi	RSCMi0216C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSCMi	RSDMi0216C	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ENMi	ENMi0216C	-	-	-	-	-	-
ESMi	ESMi0216C	-	-	-	-	-	-
CNMi	CNMi0216C	-	-	-	-	-	-
FRMi	FRMi0216C	+	+	+	+	+	+
CDPi	CDPi0316C	-	-	-	NT	NT	-
CPPi	CPPi0316C	-	-	-	-	-	-
FNFo	FNFO0316C	-	-	-	-	-	-

Tabela A4. Resultados da PCR com os pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina, campanha de primavera de 2016. - gene não amplificado; + gene amplificado; NT não testada.

Lagoa	Amostra	mcy A cdF/ cdR	mcy B FAA/ RAA	mcy C PSCF1/ PSCR1	mcy D PKDF1/ PKDR1	mcy E PKEF1 /PKER 1	mcy G PKGf1/ /PKGR 1
VMi	VMI0516K	+	-	+	+	+	+
AMi	AMI0516K	+	-	+	+	+	+
CGMi	CGMI0516K	-	-	+	-	+	-
SBMi	SBMI0516K	-	-	-	-	-	-
FGMi	FGMI0516K	-	-	-	-	-	-
RSSDMi	RSCMI0516K	-	-	+	-	+	-
RSSCMi	RSDMI0516K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ENMi	ENMI0516K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ESMi	ESMI0516K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CNMi	CNMI0516K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
FRMi	FRMI0516K	+	-	+	+	-	+
CDPi	CDPI0416K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	CPPI0416K	-	-	-	-	-	-
FNFo	FNFO0516K	-	-	-	-	-	-

Tabela A5. Resultados da PCR com os pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina, campanha de verão de 2016. - gene não amplificado; + gene amplificado; NT não testada.

Lagoa	Amostra	mcy A cdF/ cdR	mcy B FAA/ RAA	mcy C PSCF1/ PSCR1	mcy D PKDF1/ PKDR1	mcy E PKEF1/ PKER1	mcy G PKGf1/ /PKGR1
VMi	VMI0916K	-	-	-	+	+	-
AMi	AMI0916K	-	-	-	-	-	-
CGMi	CGMI0916K	-	-	-	+	+	-
SBMi	SBMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
FGMi	FGMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSDMi	RSCMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSCMi	RSDMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ENMi	ENMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ESMi	ESMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CNMi	CNMI0916K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
STMi	STMI0816K	-	-	-	-	-	-
FRMi	FRMI0916K	-	-	-	+	+	+
CDPi	CDPI0716K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	CPPI0716K	-	-	-	-	-	-
FNFo	FNFO0816K	-	-	-	-	-	-

Tabela A6. Resultados da PCR com os pares de primers para amplificação dos genes produtores de microcistina, campanha de outono de 2016. - gene não amplificado; + gene amplificado; NT não testada.

Lagoa	Amostra	mcy A	mcy B	mcy C	mcy D	mcy E	mcy G
		cdF/ cdR	FAA/ RAA	PSCF1/ PSCR1	PKDF1/ PKDR1	PKEF1/ PKER1	PKGf1/ PKGR1
VMi	VMi1116K	-	-	+	+	+	+
AMi	AMi1116K	-	-	-	-	+	-
CGMi	CGMi1116K	-	-	+	+	+	-
SBMi	SBMi1116K	-	-	-	-	-	-
FGMi	FGMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSDMi	RSCMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RSSCMi	RSdMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ENMi	ENMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ESMi	ESMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CNMi	CNMi1116K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
STMi	STMi1116K	-	-	-	-	-	-
FRMi	FRMi1116K	-	-	+	+	+	-
CDPi	CDPi1016K	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CPPi	CPPi1016K	-	-	-	-	-	-
FNFo	FNFo1016K	-	-	-	-	-	-